



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**SISTEMÁTICA MOLECULAR DEL GÉNERO  
*FISSURELLA* EN EL PACÍFICO SUDORIENTAL**

Memoria que para optar al Grado de  
**Doctor en Bioquímica y Biología Molecular presenta**

ALBERTO NICOLÁS OLIVARES PAZ

Santiago de Compostela – España, 2007



**MANUEL REY MÉNDEZ**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informa:

Que la memoria adjunta, titulada: **Sistemática Molecular del Género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental**, que para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, presenta Don **Alberto Nicolás Olivares Paz**, ha sido realizada bajo mi dirección en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología.

Considerando que constituye trabajo de Tesis, autorizo su presentación en Santiago de Compostela a cinco de enero de dos mil siete.

El Doctorando,

VºBº del Director

Fdo.: Alberto N. Olivares Paz

Fdo.: Dr. Manuel Rey Méndez



## AGRADECIMIENTOS

Desde estas páginas deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas e instituciones que de forma directa o indirecta han colaborado en la realización de este programa de doctorado.

Al doctor Manuel Rey Méndez, director de esta tesis por su permanente apoyo y dedicación. Por la oportunidad de haber ingresado a su unidad, por las facilidades otorgadas para la realización de las diferentes actividades llevadas a cabo durante mi estadía en ella, y por su sincera y franca amistad.

A Javier Quinteiro, por entregarme horas de su trabajo en la orientación, planificación y diseño de las diferentes actividades experimentales. Por su permanente apoyo, enseñanza y consejos brindados durante la estancia en el laboratorio. Su experiencia, conocimientos y dominio del área temática, fueron el pilar fundamental para concluir esta memoria.

A Jorge Rodríguez, por su esmerada ayuda y colaboración brindada en la realización de actividades del laboratorio, algunas de las cuales al principio se me hacían casi imposibles.

A los colegas del departamento de Acuicultura de la Universidad de Antofagasta, por la generosidad para permitirme realizar estos estudios de doctorado y a aquellos que además suplieron mi actividad docente durante los años que permanecí alejado de la institución. A Oscar Zúñiga y Gladys Ramos, por su paciencia para ayudarme en la obtención y envío desde Chile de numerosos artículos.

A todos los que colaboraron en la ardua labor de búsqueda y obtención de los ejemplares de las diferentes especies de lapas desde distintos puntos de Chile y de otros países, entre ellos y esperando no olvidar a nadie a Jorge Oliva, Eduardo Díaz, Andrés Olguín, Braulio Montanares, Alberto Paredes,

Francisco Rivera, José Sánchez, Rodrigo Burgos, Cesar Lodeiros, Julio Pérez y Nieves González.

También, para quienes ayudaron en el procesamiento de los animales, disección y almacenamiento de las numerosas muestras: Paula Medina, Katherine Dawson, María Maldonado, Patricia Olivares y Dania Olivares.

A mis hijas Dania y Patricia y a mi esposa María Angélica, por el constante estímulo para que nunca claudicara en esta nueva etapa de mi formación académica.

Durante el período de realización de esta memoria, se ha recibido financiación para desarrollar diferentes proyectos que, en algunos casos, permitieron o facilitaron el desarrollo de este trabajo. Por ello, quiero agradecer a las diferentes instituciones su ayuda:

A la Unión Europea por financiar el proyecto: QLK1-CT-2000-30476 (años 2001 a 2003).

A los Ministerios de Ciencia y Tecnología (MCYT) y al de Educación y Ciencia (MEC), por la financiación de los proyectos: AGL2000-3115-CE y AGL2004-06411-CO2-02/ALI (años 2001 a 2007).

A la Xunta de Galicia por la financiación de los proyectos: PGIDT01PXI20005PM y PGIDIT05PXIC20002PN (años 2001 a 2008).

A las Instituciones que posibilitaron el financiamiento de mi estancia.

Mis agradecimientos a la Universidad de Antofagasta, por las facilidades administrativas otorgadas. A MECESUP UANTOF 2004, por la beca otorgada durante los años 2004-2005.

A la Universidad de Santiago de Compostela por la beca concedida en los años 2006 – 2007.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela por las facilidades que me ha brindado para realizar este Programa de Doctorado.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>15</b>
<b>Listado de Figuras .....</b>	<b>17</b>
<b>Listado de Tablas .....</b>	<b>21</b>
 <b>INTRODUCCIÓN .....</b>	 <b>23</b>
<b>I. CONDICIONES DEL MEDIO Y REGISTROS PALEONTOLÓGICOS .....</b>	<b>25</b>
I.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO .....	26
I.2. ZONAS BIOCLIMÁTICAS .....	27
I.3. CORRIENTES MARINAS .....	30
I.4. PROVINCIAS BIOGEOGRÁFICAS .....	33
I.5. REGISTROS PALEONTOLÓGICOS DE MOLUSCOS .....	35
<b>II. ANTECEDENTES GENERALES DE LOS MOLUSCOS .....</b>	<b>38</b>
II.1. FILO MOLLUSCA .....	38
II.1.A. Morfología y Sistemática .....	38
II.2. CLASE GASTROPODA .....	45
II.2.A. Morfología .....	45
II.2.B. Sistemática y filogenia de gasterópodos .....	47
II.3. SISTEMÁTICA Y FILOGENIA DE VETIGASTROPODA .....	51
II.4. SUPERFAMILIA FISSURELLOIDEA .....	54
II.4.A. Morfología .....	54
II.4.B. Sistemática .....	55
II.4.C. Filogenia .....	58
<b>III. EL GÉNERO <i>FISSURELLA</i> EN EL PACÍFICO SUDORIENTAL .....</b>	<b>58</b>
III.1. SISTEMÁTICA Y CLASIFICACIÓN .....	58
III.2. GRUPOS DE ESPECIES .....	63
III.3. ANTECEDENTES BIOLÓGICOS DE <i>FISSURELLA</i> .....	65
III.3.A. Taxonomía .....	65
III.3.B. Distribución .....	68
III.3.C. Hábitat .....	70
III.3.D. Alimentación .....	73

III.3.E. Epibiontes .....	75
III.3.F. Sexo .....	76
III.3.G.Parasitismo gonadal .....	77
III.3.H.Reproducción .....	78
III.3.I. Morfometría .....	79
<b>IV. FISSURELLA COMO RECURSO .....</b>	<b>81</b>
IV.1. DURANTE EL HOLOCENO .....	81
IV.2. EN EL PERÍODO ACTUAL .....	85
<b>V. LOS CONCEPTOS DE ESPECIE Y EL PROCESO DE ESPECIACIÓN .....</b>	<b>90</b>
V.1. CONCEPTO DE ESPECIE .....	90
V.2. MECANISMOS DE ESPECIACIÓN .....	93
V.3. INFERENCIA FILOGENÉTICA .....	96
<b>VI. FILOGENIA MOLECULAR.....</b>	<b>98</b>
VI.1. ATRIBUTOS DEL ADN .....	98
VI.2. ADN MITOCONDRIAL .....	99
VI.3. MUTACIÓN. ....	103
VI.4. MUTACIÓN PUNTUAL DEL ADN .....	104
VI.5. ESTIMACIÓN DE LAS DISTANCIAS GENÉTICAS.....	106
VI.6. ÁRBOL FILOGENÉTICO .....	107
VI.7. MÉTODOS DE RECONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES .....	108
VI.8. TEST ESTADÍSTICO PARA TOPOLOGÍAS DE ÁRBOL .....	112
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>114</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>118</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>119</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
<b>I. ÁREA DE MUESTREO .....</b>	<b>123</b>
<b>II. LOCALIDADES DE COLECTA.....</b>	<b>125</b>
<b>III. PRESERVACIÓN DE LOS EJEMPLARES Y TOMA DE MUESTRAS.....</b>	<b>126</b>
<b>IV. AISLAMIENTO DEL ADN TOTAL.....</b>	<b>127</b>



<b>V. AMPLIFICACIÓN DEL ADN.....</b>	<b>128</b>
V.1. GEN RIBOSOMAL 16S (ARNr 16S) .....	129
V.2. GEN CITOCROMO B (CYTB).....	130
V.3. GEN DE LA SUBUNIDAD 1 DE LA NADH DESHIDROGENASA (ND1) .....	130
V.3.A. Diseño de cebadores específicos.....	131
V.3.B. Amplificación parcial del gen ND1 .....	131
V.4. GEN HISTONA H3 (H3) .....	132
V.5. ESPACIADORES ITS1 E ITS2 .....	132
<b>VI. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR.....</b>	<b>134</b>
<b>VII. SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....</b>	<b>135</b>
VII.1. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR .....	135
VII.2. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.....	135
VII.3. ELECTROFORESIS Y DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE SECUENCIACIÓN .....	136
<b>VIII. VERIFICACIÓN DE LOS ELECTROFEROGRAMAS .....</b>	<b>136</b>
<b>IX. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS .....</b>	<b>136</b>
<b>X. CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS.....</b>	<b>137</b>
<b>XI. INFERENCIA FILOGENÉTICA .....</b>	<b>138</b>
XI.1. ANÁLISIS DE LA CONGRUENCIA DE LOS JUEGOS DE DATOS .....	138
XI.2. ANÁLISIS BASADOS EN EL CRITERIO DE DISTANCIAS GENÉTICAS .....	139
XI.3. ANÁLISIS BASADOS EN EL CRITERIO DE PARSIMONIA .....	140
XI.4. ANÁLISIS BASADOS EN EL CRITERIO DE VEROSIMILITUD .....	141
XI.5. ANÁLISIS MEDIANTE INFERENCIA BAYESIANA.....	141
<b>XII. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN AMPLIFICADOS       AL AZAR (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA,       RAPD).....</b>	<b>142</b>
<b>XIII. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....</b>	<b>144</b>
XIII.1. ESPECIES SELECCIONADAS .....	144
XIII.2. AISLAMIENTO DEL ADN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN ND1 .....	144
XIII.3. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL .....	145
<b>XIV. METODOLOGÍA DE AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE       <i>FISSURELLA</i> MEDIANTE PCR- RFLP .....</b>	<b>146</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>149</b>
<b>I. CALIDAD Y PUREZA DEL ADN TOTAL AISLADO .....</b>	<b>151</b>
<b>II. AMPLIFICACIÓN DE GENES.....</b>	<b>152</b>

<b>III. SECUENCIACIÓN .....</b>	<b>153</b>
<b>IV. CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS.....</b>	<b>154</b>
IV.1. SEGMENTO DEL GEN CITOCROMO B (CYTB) .....	154
IV.2. SEGMENTO DEL GEN ARNr 16S.....	155
IV.3. SEGMENTO DEL GEN ARNt-Leu Y ND1 .....	156
IV.4. SEGMENTO DEL GEN NUCLEAR HISTONA H3 (H3).....	158
IV.5. SECUENCIAS NUCLEARES DE LOS INTERESPACIADORES ITS1-ITS2.....	158
<b>V. INFERENCIA DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS EN EL GÉNERO <i>FISSURELLA</i>.....</b>	<b>159</b>
V.1. DINÁMICA MUTACIONAL.....	159
V.1.A. Evaluación de los niveles de saturación.....	159
V.1.B. Divergencia genética.....	160
V.2. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN CITOCROMO B.....	163
V.3. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN SECUENCIAS PARCIALES DE LOS GENES ARNt-Leu Y ND1 .....	165
V.4. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN ARNr 16S. ....	167
V.5. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN SECUENCIAS PARCIALES DEL GEN H3.....	169
V.6. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN SECUENCIAS PARCIALES DE ITS1 E ITS2 .....	171
V.7. FILOGENIA MOLECULAR BASADA EN JUEGOS DE DATOS MITOCONDRIALES COMBINADOS .....	172
V.7.A. Filogenia molecular basada en secuencias combinadas CYTB, ARNt-Leu y ND1.....	173
V.7.A.a. Análisis basados en el criterio de distancias genéticas .....	173
V.7.A.b. Análisis basado en el criterio de parsimonia .....	175
V.7.A.c. Análisis basado en el criterio de máxima verosimilitud.....	178
V.7.B. Filogenia molecular basada en secuencias combinadas CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S.....	179
V.7.B.a. Análisis basado en el criterio de distancias genéticas.....	180
V.7.B.b. Análisis basado en el criterio de parsimonia .....	183
V.7.B.c. Análisis basado en el criterio de máxima verosimilitud.....	184
V.7.B.d. Análisis basado en inferencia bayesiana .....	185
V.8. RELACIONES FILOGENÉTICAS BASADAS EN ANÁLISIS DE RAPD.....	187
<b>VI. AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>FISSURELLA</i> MEDIANTE PCR-RFLP .....</b>	<b>190</b>
<b>VII. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>FISSURELLA</i> EN EL PACÍFICO SUDORIENTAL .....</b>	<b>193</b>
VII.1. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE <i>Fissurella crassa</i> .....	193

VII.1.A.	Variabilidad genética en las secuencias ND1 .....	193
VII.1.B.	Relaciones entre los haplotipos de <i>Fissurella crassa</i> .....	195
VII.1.C.	Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos .....	197
VII.1.D.	Análisis de los estadísticos poblacionales .....	197
VII.1.E.	Análisis de la varianza molecular (AMOVA) .....	197
VII.1.F.	Historia demográfica .....	198
VII.2.	ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE <i>Fissurella limbata</i> .....	200
VII.2.A.	Variabilidad genética en las secuencias ND1 .....	200
VII.2.B.	Relaciones entre los haplotipos de <i>Fissurella limbata</i> .....	202
VII.2.C.	Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos .....	203
VII.2.D.	Análisis de los estadísticos poblacionales .....	203
VII.2.E.	Análisis de la varianza molecular (AMOVA) .....	204
VII.2.F.	Historia demográfica .....	205
VII.3.	ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE <i>Fissurella latimarginata</i> - <i>Fissurella cumingi</i> .....	206
VII.3.A.	Variabilidad genética en las secuencias ND1 .....	206
VII.3.B.	Relaciones entre los haplotipos de <i>Fissurella latimarginata</i> - <i>F. cumingi</i> .....	209
VII.3.C.	Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos .....	210
VII.3.D.	Análisis de los estadísticos poblacionales .....	210
VII.3.E.	Análisis de la varianza molecular (AMOVA) .....	210
VII.3.F.	Historia demográfica .....	212
<b>DISCUSIÓN .....</b>		<b>215</b>
<b>I. RELACIONES FILOGENÉTICAS CONSENSUADAS .....</b>		<b>217</b>
<b>II. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA ACTUAL Y FILOGENIA MOLECULAR .....</b>		<b>219</b>
II.1.	ORGANIZACIÓN TAXONÓMICA A NIVEL DE SUBGÉNEROS .....	219
II.2.	GRUPOS DE ESPECIES DE <i>FISSURELLA</i> .....	220
II.3.	CONGRUENCIA ENTRE ESPECIE MORFOLÓGICA Y FILOGENÉTICA EN <i>FISSURELLA</i> .....	222
<b>III. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL .....</b>		<b>224</b>
III.1.	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS VALORES DE DIVERSIDAD E HISTORIA DEMOGRÁFICA .....	224
III.2.	ESTRUCTURA GENÉTICA .....	226
<b>IV. AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES .....</b>		<b>227</b>
<b>V. FILOGEOGRAFÍA Y ORIGEN GEOGRÁFICO DEL GÉNERO <i>FISSURELLA</i> EN EL PACÍFICO SUDORIENTAL .....</b>		<b>229</b>
V.1.	RELACIÓN CON EL ANTIGUO MACROCONTINENTE AUSTRAL GONDWANA. ....	229

V.2.	ORIGEN ATLÁNTICO Y COLONIZACIÓN DEL PACÍFICO POR EL EXTREMO SUR DEL CONTINENTE SUDAMERICANO .....	232
V.3.	ORIGEN ATLÁNTICO Y COLONIZACIÓN DEL PACÍFICO PREVIA AL ELEVAMIENTO DEL ISTMO DE PANAMÁ .....	234
V.3.A.	Calibración molecular .....	234
V.3.B.	Eventos de especiación en el Pacífico Sudoriental .....	237
V.3.C.	Historia evolutiva.....	238
 <b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>241</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>245</b>
 <b>ANEXOS .....</b>		<b>269</b>
ANEXO 1 .....		271
ANEXO 2 .....		273
ANEXO 3 .....		275
ANEXO 4 .....		278

## RESUMEN

Las relaciones filogenéticas de las especies clasificadas en el género *Fissurella*, y con distribución en el Pacífico Sudoriental, han sido inferidas a partir del análisis de la secuencia parcial nucleotídica de los genes mitocondriales del citocromo b (CYTB), subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1) y ARNr 16S, y de los genes nucleares del complejo ribosomal ARNr 18S-ITS1-ARNr 5.8S-ITS2-ARNr 28S e histona H3. Además, se ha procedido a la caracterización de patrones de RAPDs para dichas especies. Tales inferencias discrepan y son incompatibles con la actual clasificación y taxonomía, basada en caracteres morfológicos. En particular, se han detectado grupos de especies que presentan relaciones en politomía, siendo consideradas como “complejo latimarginata” (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*) y “complejo costata-picta” (*F. costata* y *F. picta*), lo que plantea una revisión formal de su taxonomía.

Los datos paleontológicos, la datación de eventos de la historia evolutiva a través de la calibración de un reloj molecular para el gen CYTB (valor medio de 2,77% de divergencia por cada millón de años), y las relaciones filogenéticas inferidas indican un escenario probable de la evolución de las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental. La colonización del Pacífico, a partir de una forma ancestral atlántica, tendría lugar en el Plioceno, desde el Atlántico a través de la región caribeña. La elevación del Istmo de Panamá, conduciría al aislamiento de las especies atlánticas y pacíficas posibilitando su aislamiento y diferenciación genética. Dicho cierre, junto con enfriamientos pliocénicos, y los posteriores eventos de glaciación pleistocénicos son motores de la especiación en el Pacífico Sudoriental.

La estructura genética poblacional de *F. crassa*, *F. limbata* y del complejo *F. latimarginata* - *F. cumingi* indica un elevado flujo génico entre las

áreas muestreadas. Los niveles de diversidad genética y la historia demográfica parecen ser sensibles a factores como el grado de protección del hábitat a la explotación y depredación, o a bruscos cambios en el nivel del mar. El nivel de flujo génico estimado tiene implicaciones para la gestión de sistemas de explotación de este recurso. Las poblaciones locales difícilmente sufrirían un colapso si son susceptibles de ser colonizadas mediante flujo larvario natural o repobladas sin conllevar pérdida de variabilidad genética.

Los datos obtenidos de las secuencias parciales del CYTB, permiten una metodología de PCR-RFLP, dirigida a la autenticación de las “lapas” del género *Fissurella* presentes en la costa del Pacífico Sudoriental, mediante la digestión de un amplicón del CYTB con las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III y la observación de los patrones de restricción específicos. Esta metodología es aplicable a la autenticación de toda la gama de presentación comercial de las lapas del género *Fissurella*. También es de aplicación en la identificación de individuos en cualquier estadio de su desarrollo ontogenético (huevos, embriones, larvas, semillas, estados de reciente asentamiento y juveniles) y podría ser de gran utilidad en estudios de biología básica, pesquera y ecología, así como en la trazabilidad de las especies del género *Fissurella* durante la cadena de comercialización.

## SUMMARY

The phylogenetic relationships of the species belonging to the *Fissurella* genus and distributed along the Southeastern Pacific, have been inferred from the analysis of the partial nucleotide sequence of the mitochondrial cytochrome b (CYTB), NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) and 16S rRNA genes and nuclear ribosomal complex 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2- 28S rRNA and histone H3 genes. In addition it has been characterized a RAPDs pattern for these species. These inferences differ and are incompatible with the present classification and taxonomy, based in morphological characters. Concretely, a groups of species displayed relationships that are politomies, being considered as “latimarginata complex” (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* and *F. bridgesii*) and “complex costata-picta” (*F. costata* and *F. picta*), raising into question the need for a formal taxonomic revision.

The paleontological data, the inferred dating of events of evolutionary history by means of a molecular clock calibration for gene CYTB (average value of 2.77% of divergence by million years), and the phylogenetic relationships indicate a probable evolutionary scenario for the evolution of the species of *Fissurella* from the Southeastern Pacific. The colonization of the Pacific, from an Atlantic ancestral form, would take place in the Pliocene, from the Atlantic through the Caribbean region. The rising of the Isthmus of Panama, would lead to the isolation of the Pacific from Atlantic species and making possible its isolation and genetic differentiation. This closing, along with pliocenic cooling, and the later pleistocenic glaciation events are responsible for the speciation along the Southeastern Pacific.

The population genetic structure of *F. crassa*, *F. limbata* and of the complex *F. latimarginata* - *F. cumingi* indicates a high gene flow between

the sampled areas. The levels of genetic diversity and demographic history seem to be affected by factors like the level of protection of the habitat to the exploitation and depredation or to abrupt changes in the sea level. The level of the estimated gene flow has implications for the management of this seafood resource. The local populations hardly would undergo a collapse if they are susceptible to be colonized by means of natural larval flow or to be repopulated without implying any loss of genetic variability.

The collected data of partial sequences of the CYTB, allows a methodology of PCR-RFLP, for the authentication of key-hole limpets of the *Fissurella* genus present in the Southeastern Pacific, by means of the digestion of the CYTB amplicon with the enzymes *Hpy*CH4 V and *Nla* III and the observation of the specific restriction patterns. This methodology is applicable to the authentication of all the range of commercial products. Also it is of application in the identification of individuals in any stage of his ontogenetic development (ova, embryos, larvae, seeds, youthful states of recent settlement) and could be very useful in studies of biology, fishing and ecology, as well as in the traceability of the species of the *Fissurella* genus, during the commercialization chain.



## Listado de Figuras

Figura 1. Muestra la ubicación geográfica de Chile, de cuyo litoral provienen los ejemplares de este estudio. ....	26
Figura 2. Esquema de las principales corrientes marinas en Chile. CCC: Contracorriente cálida; CH-O: Corriente Humboldt oceánica; CH-C: Corriente Humboldt costera; CDO: Corriente deriva del oeste; CCH: Corriente Cabo de Hornos. ....	31
Figura 3. Fósiles del Mioceno localizados en Chile Central (Lebu). Nielsen (2003). ....	37
Figura 4. Imágenes de conchas de diferentes géneros de la familia Fissurellidae. ....	54
Figura 5. Imágenes de especies representativas del género <i>Fissurella</i> : a: <i>F. crassa</i> , b: <i>F. limbata</i> , c: <i>F. maxima</i> , d: <i>F. cumingi</i> , e: <i>F. pulchra</i> , f: <i>F. costata</i> , g: <i>F. latimarginata</i> , h: <i>F. picta</i> , i: <i>F. nigra</i> . ....	67
Figura 6. Esquema de la distribución de las especies de <i>Fissurella</i> en la región del Pacífico Sudoriental. ....	69
Figura 7. Conchas de <i>Fissurella</i> proveniente de fogones en campamento Acha – 2 (7.000 a.C.). a: <i>Fissurella maxima</i> , b: <i>Fissurella latimarginata</i> . ....	83
Figura 8. Promedio anual de desembarque de <i>Fissurella</i> y su relación con el total de gasterópodos. ....	87
Figura 9. Tipos de sustituciones de nucleótidos. ts: transición; tv: transversión. ....	105
Figura 10. Mapa indicando las localizaciones de las áreas de muestreo para cada una de las especies del subgénero <i>Fissurella</i> de Chile. ....	123
Figura 11. Posiciones relativas de los cebadores para amplificar en la primera etapa el gen ARNr y en la segunda etapa los segmentos espaciadores internos ITS1 y el ITS2. (ETS: segmento espaciador externo, localizado entre genes ARNr). ....	133
Figura 12. Gel de agarosa, mostrando la variabilidad de tamaño de los segmentos de ADN aislado de diferentes especies. Código de especies según lo indicado en Tabla 14. ....	151
Figura 13. Muestra representativa de los diferentes genes amplificados mediante PCR y el tamaño de los segmentos en comparación al marcador (M). C: Control negativo; 1-2: CYTB; 3-4: ND1; 5-7: ARNr 16S; 8-9: ARNr 18S+ITS1+ARNr 5.8S+ ITS2+ARNr 28S; 10-11 ITS1; 12-13: ITS2; 14-15: histona H3. ....	152

- Figura 14. Segmentos de electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los siguientes genes: a: CYTB; b: ARNr 16S; c: ARNt-Leu - ND1; d: H3; e: ITS2. .... 153
- Figura 15. Relación entre la distancia genética y el número de transiciones y transversiones para los genes mitocondriales codificantes CYTB y ND1. Se evalúan por separado el total de posiciones y las mutaciones en la primera, segunda y tercera posición del codón. .... 160
- Figura 16. Árbol filogenético del subgénero *Fissurella* de Chile, obtenido con secuencias parciales del citocromo b. Modelo de distancia de Tamura-Nei y método de Neighbor-Joining. Para enraizar el árbol se usó *D. graeca* (DGRA1). En los nodos se indican valores de replicación (x2000) superiores al 50% y se han colapsado los inferiores. .... 164
- Figura 17. Árbol filogenético del subgénero *Fissurella* con secuencias de ARNt-Leu-ND1. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Sobre las ramas se señalan valores de replicación (x2000) superiores al 50% y están colapsados los valores inferiores. El grupo externo para enraizar el árbol es DGRA1 ..... 166
- Figura 18. Árbol de filogenia del subgénero *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, inferido con secuencias del gen ARNr 16S y enraizado con la especie externa *D. graeca*. Método de Neighbor-Joining, con modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación de los nodos superiores al 50% se señalan sobre las ramas y los inferiores han sido colapsados. .... 168
- Figura 19. Árbol elaborado con secuencias del gen H3, mostrando las relaciones entre especies de distintos géneros de la familia Fissurellidae y entre *Fissurella* del Pacífico Sudoriental con *Fissurella* del Atlántico. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación (x 2000) superiores al 50% se indican sobre las ramas y los inferiores están colapsados. Especies de *Haliotis* corresponden al grupo externo. (\* Secuencias obtenidas del GenBank). .... 170
- Figura 20. Árbol elaborado con secuencias de los interespaciadores ITS1 e ITS2, mostrando las relaciones entre especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental usando como grupo externo a *F. nimbosa* del Atlántico. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación (x 2000) se indican sobre las ramas. .... 172
- Figura 21. Árboles filogenéticos obtenidos a partir del juego de datos combinado de secuencias CYTB+ND1, a partir de los programas MEGA (A) y PAUP (B). .... 174
- Figura 22. Árbol consenso reconstruido según el criterio de parsimonia con el programa PAUP y a partir de las secuencias combinadas del CYTB,

ARNt-Leu y ND1. Con el símbolo rojo se indican aquellos nodos cuya topología ha sido mantenida. Como grupo externo se ha usado DGRA1.....	176
Figura 23. Árbol reconstruido según el criterio de máxima verosimilitud con el programa PAUP y a partir de las secuencias combinadas del CYTB, ARNt-Leu y ND1. El modelo evolutivo se corresponde con HKY+G. El valor $-Ln= 4811.6096$ . Como grupo externo se ha usado a DGRA1. ....	178
Figura 24. Árbol basado en distancias de Tamura-Nei mediante el método de Neighbor-Joining en MEGA para 31 especímenes representativos de las 15 especies de <i>Fissurella</i> consideradas. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes indican los valores para 2.000 replicaciones.....	181
Figura 25. Árbol consenso basado en el modelo de Tamura-Nei mediante el método de Neighbor-Joining en PAUP para 31 especímenes representativos de las 15 especies de <i>Fissurella</i> consideradas. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes indican los valores para 2.000 replicaciones. ....	182
Figura 26. Árbol consenso (50%) basado en el criterio de parsimonia para 31 especímenes representativos de las 15 especies de <i>Fissurella</i> consideradas. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes indican los valores para 100 replicaciones. ....	183
Figura 27. Árbol reconstruido según el criterio de máxima verosimilitud con el programa PAUP y a partir de las secuencias combinadas del CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. El modelo evolutivo se corresponde con GTR+G+I. El valor $-Ln= 5992.3924$ . Como grupo externo se ha usado a DGRA1.....	184
Figura 28. Árbol basado en la inferencia bayesiana realizado mediante el programa Mr Bayes versión 3.1. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes a los nodos indican los valores de probabilidad “a posteriori”.....	186
Figura 29. Fragmentos de ADN de tamaños variables obtenidos para distintas especies de <i>Fissurella</i> , mediante el método RAPD, usando el cebador 5'-GTAGACCCGT-3'. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. ....	187

- Figura 30. Filogenia del subgénero *Fissurella*, reconstruida por el método de UPGMA, y la obtención de índices de similitud, debido a la presencia o ausencia de bandas comunes en los patrones de bandeo generados por técnica de RAPD, para cada especie analizada. ....189
- Figura 31. Geles de agarosa mostrando los perfiles de restricción tras la digestión del producto de PCR obtenidos de diversas especies de *Fissurella* y situado en el citocromo b, con las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III. ....191
- Figura 32. Entramado de haplotipos de la secuencia ND1, obtenidos para la especie *F. crassa*, basado en el algoritmo “median-joining”. Cada círculo indica un haplotipo y su área es proporcional a la frecuencia absoluta de haplotipos. La fracción de cada círculo indica la proporción de haplotipos presente en las poblaciones estudiadas mediante el código de color: ● Iquique, ● Coloso, ● Tilgo. ....196
- Figura 33. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de *F. crassa*.....199
- Figura 34. Entramado de haplotipos de la secuencia ND1, obtenidos para la especie *F. limbata*, basado en el algoritmo “median-joining”. Cada círculo indica un haplotipo y su área es proporcional a la frecuencia absoluta de haplotipos. La fracción de cada círculo indica el número de haplotipos presente en las poblaciones estudiadas mediante el código de color: ● Iquique, ● Coloso, ● Tilgo. ....202
- Figura 35. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de *F. limbata*.....205
- Figura 36. Entramado de haplotipos de la secuencia ND1, obtenidos para las especies *F. latimarginata*-*F. cumingi*, basado en el algoritmo “median-joining”. Cada círculo indica un haplotipo y su área es proporcional a la frecuencia absoluta de haplotipos. La fracción de cada círculo indica el número de haplotipos presente en las poblaciones estudiadas mediante el código de color: ● Iquique, ● Coloso, ● Tilgo, ● La Isla de Algarrobo, ● Arco Cocholgue, ● Polocue. ....209
- Figura 37. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de las especies consideradas (*F. latimarginata* y *F. cumingi*) del “complejo latimarginata”. ....213
- Figura 38. Árbol filogenético consenso de las diversas topologías obtenidas con los distintos juegos de datos evaluados con metodologías alternativas. ....218

## Listado de Tablas

Tabla 1. Características de las regiones bioclimáticas de la zona mediterránea. (1mm=1L/m <sup>2</sup> ).....	28
Tabla 2. Clasificación de los moluscos (*). *Salvini-Plawen, 1980 (+ = grupo extinguido) .....	43
Tabla 3. Clasificaciones de Archaeogastropoda. Bieler (1992) <sup>#</sup> (+: indica taxa extinguida; *: taxa que fueron marcadas como parafiléticas; ? ubicado como en el original).....	48
Tabla 4. Clasificaciones de Caenogastropoda/Heterostropha. Bieler (1992) <sup>#</sup> . Los números entre paréntesis indican el número de los subórdenes incluidos.....	48
Tabla 5. Clasificaciones de Opisthobranchia. Bieler (1992) <sup>#</sup> . Los números entre paréntesis indican el número de los subórdenes incluidos.....	49
Tabla 6. Clasificaciones de Pulmonata. Bieler (1992) <sup>#</sup> .....	50
Tabla 7. Sistemática de Fissurellidae. Vaught (1989) y Lindner (2000). .....	56
Tabla 8. Denominación actual de las especies del subgénero <i>Fissurella</i> . Nombres anteriores y provincia biogeográfica a la que pertenecen. Nómina elaborada en base a la lista publicada por McLean, 1984.....	59
Tabla 9. Lista de caracteres clave (McLean, 1984). .....	61
Tabla 10. Lista de caracteres clave. Continuación (McLean, 1984). .....	62
Tabla 11. Relaciones entre dimensiones de la concha en especies de <i>Fissurella</i> . .....	80
Tabla 12. Relaciones de dimensiones del orificio apical con la concha. ....	80
Tabla 13. Relaciones entre el largo y peso de las partes del cuerpo del animal.....	81
Tabla 14. Localidades de colecta de los ejemplares de las diferentes especies, sus coordenadas geográficas y el código de identificación.....	125
Tabla 15. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del citocromo b para las especies analizadas del género <i>Fissurella</i> . Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones. ....	161
Tabla 16. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del ND1 para las especies analizadas del género <i>Fissurella</i> . Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones.....	162
Tabla 17. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del ARNr 16S para las especies analizadas del género <i>Fissurella</i> . Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones. ....	162

Tabla 18. Parámetros de los modelos evolutivos seleccionados para el juego de datos combinado CYTB+ND1.....	173
Tabla 19. Parámetros de los modelos evolutivos seleccionados para el juego de datos combinado CYTB+ARNt-Leu+ND1+ ARNr 16S.....	180
Tabla 20. Recopilación de los cortes producidos y de los fragmentos generados tras la digestión del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas <i>Hpy</i> CH4 V y <i>Nla</i> III. (A) a (F): patrones de restricción, (O): sin corte.....	192
Tabla 21. Variabilidad genética a nivel poblacional de <i>Fissurella crassa</i> .....	194
Tabla 22. Frecuencias de haplotipos en tres poblaciones de <i>Fissurella crassa</i> . ....	194
Tabla 23. Matriz de estimaciones de $F_{ST}$ entre tres poblaciones de <i>F. crassa</i> . Encima de la diagonal se indican las estimaciones de $Nm$ a partir de estimaciones de $F_{ST}$ linearizados.....	197
Tabla 24. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de <i>F. crassa</i> , en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1.....	198
Tabla 25. Parámetros estimados para las poblaciones de <i>Fissurella crassa</i> .....	199
Tabla 26. Variabilidad genética a nivel poblacional de <i>Fissurella limbata</i> .....	200
Tabla 27. Listado de haplotipos en tres poblaciones de <i>Fissurella limbata</i> (Abs: absoluta; Rel: relativa). ....	201
Tabla 28. Matriz de estimaciones de $F_{ST}$ entre tres poblaciones de <i>F. limbata</i> . Encima de la diagonal se indican las estimaciones de $Nm$ a partir de estimaciones de $F_{ST}$ linearizados. ....	203
Tabla 29. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de <i>F. limbata</i> , en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1 .....	204
Tabla 30. Parámetros estimados para las poblaciones de <i>Fissurella limbata</i> .....	205
Tabla 31. Estructura genética en el complejo de poblaciones de <i>F. latimarginata</i> - <i>F. cumingi</i> que habitan en seis localidades.....	206
Tabla 32. Frecuencia de haplotipos en poblaciones de <i>F. cumingi</i> – <i>F. latimarginata</i> . Hap: Haplotipos; Fa: Frecuencia absoluta; Fr: Frecuencia relativa, LIA: La Isla de Algarrobo; A. Co.: Arco Cocholgue.....	208
Tabla 33. Matriz de estimaciones de $F_{ST}$ entre seis poblaciones de <i>F. latimarginata</i> - <i>F. cumingi</i> . Encima de la diagonal se indican las estimaciones de $Nm$ a partir de estimaciones de $F_{ST}$ linearizados.....	210
Tabla 34. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis poblaciones de <i>F. latimarginata</i> - <i>F. cumingi</i> en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1. ....	211
Tabla 35. Parámetros estimados para las poblaciones de <i>F. latimarginata</i> - <i>F. cumingi</i> . ....	212

# INTRODUCCIÓN







La introducción general de esta memoria se ha dividido en seis apartados a través de los cuales se describe el medio natural en el que se desarrollan los organismos que son objeto de nuestro estudio y el registro histórico en el que emergieron en la costa del territorio chileno; los antecedentes generales del filo Mollusca y los grupos taxonómicos (clase Gastropoda, suborden Vetigastropoda, superfamilia Fissurelloidea) a los que pertenece el género *Fissurella*; antecedentes generales y biológicos del subgénero *Fissurella*; la importancia como recurso de las especies de este subgénero desde el asentamiento de las poblaciones en zonas costeras hasta nuestros días; los modelos generales de especiación y los métodos de inferencia filogenética de los seres vivos.

## **I. Condiciones del medio y registros paleontológicos**

Las condiciones de la Tierra no han permanecido estables en el tiempo y continuamente están cambiando, debido a perturbaciones de la geomorfología por los movimientos orogénicos, epirogénicos y sísmicos, y por los cambios climáticos, los cuales modifican el ambiente en el que se desenvuelven las especies, impulsando la evolución de las mismas. Algunas incapaces de adaptarse se extinguieron dejando en algunos casos una huella, fósil o molecular, en sus descendientes que permite establecer una relación entre todas las especies extintas y existentes (Hengeveld, 1990).

Las especies se han adaptado para vivir en determinados lugares del planeta, lo cual permite decir que cada especie contiene su propia historia de vida, que las faculta para habitar determinados ambientes bajo las condiciones físicas, biológicas y climáticas que el particular hábitat les impone

(Barraclough & Herniou, 2003). Desde esta perspectiva, es importante conocer las características físicas del medio en el que habitan los organismos vivientes en general y, en particular, las especies objeto de este estudio dentro del subgénero *Fissurella*, que habitan en el área geográfica del territorio chileno.

### I.1. Ubicación geográfica del estudio

Chile está ubicado en el margen suroeste de América del Sur (Figura 1). Tiene una orientación predominante en el sentido norte-sur extendiéndose aproximadamente desde los 17° 30' S a los 56° 30' S (Cabo de Hornos). En el sentido este-oeste (entre la Cordillera de los Andes y el Océano Pacífico), el extremo norte se ubica a los 70° W y se desplaza paulatinamente al oeste hasta el meridiano 74° W, en la parte sur.



**Figura 1.** Muestra la ubicación geográfica de Chile, de cuyo litoral provienen los ejemplares de este estudio.

La línea costera abarca una longitud cercana a los 4.300 Km., de los cuales los comprendidos desde el límite con Perú y hasta la Isla de Chiloé (41° 47' S) son relativamente suaves y no presentan quiebres o alteraciones geográficas mayores (Santelices, 1989). Entre el mar y la cordillera de la costa, en sentido oeste-este, se extienden las planicies litorales; zonas que han ofrecido un suelo adecuado para el establecimiento de las poblaciones humanas.

Desde Chiloé hasta el Cabo de Hornos, área conocida como archipiélago chileno, la costa está recortada formando largas cadenas de islas con profusión de golfos, fiordos y canales que corresponde al 95% de los 55.000 km efectivos de litoral costero chileno (Camus, 2001).

## **1.2. Zonas bioclimáticas**

El clima es un factor determinante para la distribución de los organismos en la Tierra, restringiendo o favoreciendo la colonización y posterior establecimiento de las especies en determinadas regiones del planeta, lo cual queda de manifiesto por la desigual diversidad de especies en los diferentes biomas terrestres (Krebs, 2001). En el medio marino, el ecosistema más expuesto a las condiciones climáticas es el intermareal, en especial en las zonas áridas donde los rayos solares incrementan la temperatura, promueven la evaporación y las variaciones locales de la salinidad. Lo opuesto sucede en zonas lluviosas, en este caso el aporte de nutrientes por el arrastre de las aguas, favorece la productividad costera (Santelices, 1989).

En Chile continental, se diferencian cinco zonas bioclimáticas, de las cuales tres están circunscritas al borde costero (Di Castri & Hajek, 1976; Benítez 1994).

**Zona Desértica:** comprendida entre los paralelos 17° 30' S y 27° S, se distinguen dos zonas, desierto interior y desierto litoral. Esta última se

caracteriza por la escasez de precipitaciones durante el año, que no superan los 15 mm (0-15 mm) y por registrar una temperatura mínima de 13,5 °C y máxima de 21 °C (promedio 17,5 °C). En la misma desembocan dos ríos (Lluta y Loa) que tienen un caudal medio de 2,4m<sup>3</sup>/s. Estos escasos volúmenes de agua provocan ligeras fluctuaciones del gradiente de salinidad, sin afectar globalmente las concentraciones de esta zona.

**Zona Mediterránea:** se extiende desde los 27° S hasta los 39° S. En el borde costero la estratificación latitudinal comprende una serie de regiones bioclimáticas que tienen desde un máximo de 9 a 10 meses de aridez, hasta aquellas con un registro de 1-2 meses áridos y cuyas características se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 1. Características de las regiones bioclimáticas de la zona mediterránea. (1mm=1L/m<sup>2</sup>).**

Regiones	Temperatura media	Precipitación media	Aridez media
Perárida	16,5 °C	20 mm	9 – 10 meses
Árida	14,7 °C	115 mm	8 – 9 meses
Semiárida	14,0 °C	400 mm	7 meses
Subhúmeda	13,0 °C	650 mm	5 – 6 meses
Húmeda	12,7 °C	918 mm	3 – 5 meses
Perhúmeda	12,5 °C	1.100 mm	1 – 2 meses

A lo largo de esta zona mediterránea, desembocan 14 ríos que desde el norte al sur son los siguientes: Copiapó, Huasco, Elqui, Limarí, Choapa, Petorca, La Ligua, Aconcagua, Maipo, Mataquito, Maule, Itata, Bío Bío y el Imperial. En general los ríos ubicados a menor latitud tienen un caudal menor respecto a los que se encuentran localizados a mayor latitud. Así por ejemplo el río Elqui que desemboca a la altura de los 29° 50' S, tiene un caudal medio

de 15 m<sup>3</sup>/s mientras que el río Imperial, que llega al mar aproximadamente a los 38° 40' S, tiene un caudal medio de 240 m<sup>3</sup>/s.

El aporte total de los caudales de todos estos ríos, junto con el agua de las lluvias, representan una importante contribución de agua al océano, aunque no alcanzan a generar un impacto real en las masas de agua del mar, debido al efecto de la difusión que permite equilibrar los componentes químicos del agua (Camus, 2001).

**Zona Oceánica:** comprende desde los 39° S hasta el extremo austral de Chile (56° S), en ella se diferencia una región oriental con características climáticas semidesérticas y otra occidental húmeda con precipitaciones durante todo el año.

La región occidental se divide en tres subregiones. La primera, “templada”, comprende desde el paralelo 39° S hasta el 44° S, con temperatura promedio anual mínima de 6,9 °C y máxima de 14,2 °C (media 10,5 °C) y precipitación anual de 2.000 – 2.500 mm. La segunda subregión es la “templada fría” (44° S - 52° S), caracterizada por una precipitación anual de 2.500 - 3.000 mm y con temperatura promedio de 8,8 °C (máxima 12 °C y mínima 5,7 °C). La tercera subregión es la “oceánica fría” y abarca desde el límite sur de la anterior hasta los 56° S, en esta subregión se registra una precipitación anual de 3.000 – 3.500 mm, con una temperatura máxima de 9,8 °C, una mínima de 4,9 °C y un promedio anual de 7 °C. Además, en esta zona, los ríos que desembocan al mar tienen un caudal medio que fluctúa desde los 190 m<sup>3</sup>/s que registra el río Cisnes a 700 m<sup>3</sup>/s del río Palena. Otros ríos existentes en esta zona son: el Toltén, Valdivia, Bueno, Llico, Maullín, Petrohué, Reñihue, Puelo, Yelcho, Aysén, Baker, Bravo y Pascua.

Las intensas precipitaciones y los aportes de agua de los ríos, permiten que el volumen de agua que ingresa al mar cree condiciones hidrológicas

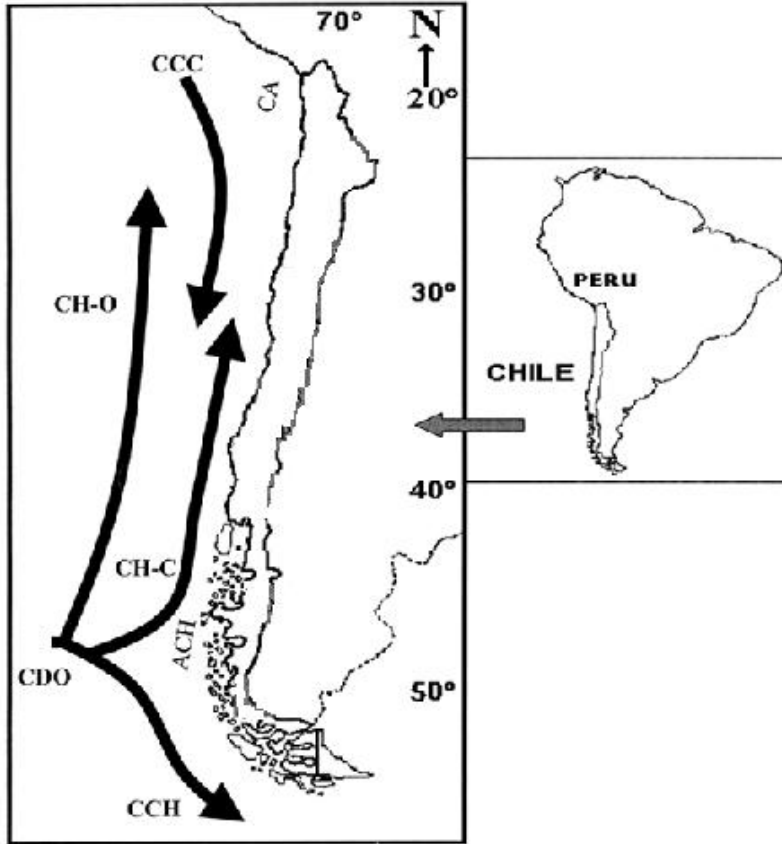
locales con relativa independencia del carácter oceanográfico de la masa de agua predominante (Camus, 2001).

### **I.3. Corrientes marinas**

Las corrientes marinas determinan en gran medida la dispersión de las especies, en especial de aquellas bentónicas litorales cuya capacidad para poder colonizar nuevos territorios es dependiente de los huevos y larvas. Éstos pasan a formar parte del plancton y viajan por medio de las corrientes marinas a posibles sitios que tengan condiciones adecuadas para la fijación, posterior establecimiento del organismo y de una nueva población (Halpin *et al.* 2004). En concordancia con lo anterior, las especies del género *Fissurella* son organismos que, de acuerdo a sus condiciones de vida, tienen la posibilidad de colonizar nuevos territorios y establecer contacto entre sus poblaciones por la capacidad del desplazamiento larvario con las corrientes marinas.

La costa de Chile está bajo la influencia predominante de las aguas heladas provenientes del extremo sur del continente (Figura 2). En esta área de la región, las aguas frías y ricas en nutrientes de la Corriente Circumpolar Antártica, al aproximarse desde el oeste al continente sudamericano, alrededor de los 50° S y antes de llegar a la costa, se divide en dos ramas, una correspondiente a la Corriente del Cabo de Hornos y otra a la rama oceánica de la Corriente de Humboldt o chileno-peruana. La corriente Cabo de Hornos bordea el extremo sur del archipiélago chileno y se desplaza hacia el este hasta unirse a la corriente de Falkland en el Océano Atlántico. De la corriente del Cabo de Hornos se origina otro flujo de agua, conocido como Corriente de los Fiordos que continúa hacia el norte, llegando a la costa a la altura de Chiloé (42° S). Esta Corriente es la rama costera del sistema de corrientes de Humboldt. Las dos ramas de Humboldt están separadas por la Contracorriente Ecuatorial, formada por un flujo de aguas cálidas en dirección sur (Camus, 2001).

Alrededor de los 6° S, la corriente de Humboldt se fusiona con las aguas cálidas de la Corriente Ecuatorial del Sur, que se dirige al Oeste del Pacífico, hacia las costas de Papúa-Nueva Guinea y Australia, produciéndose un ciclo de corriente en la región Pacífico Sur Oriental y Occidental.



**Figura 2.** Esquema de las principales corrientes marinas en Chile. CCC: Contracorriente cálida; CH-O: Corriente Humboldt oceánica; CH-C: Corriente Humboldt costera; CDO: Corriente deriva del oeste; CCH: Corriente Cabo de Hornos.

La corriente de Humboldt, en su recorrido presenta numerosos giros que son la fuente generadora de contracorrientes locales y procesos de afloramiento costero (“upwelling”). El afloramiento está asociado principalmente a la masa de agua subsuperficial, emergiendo las aguas subantárticas de la corriente de Humboldt. Estos afloramientos son responsables de la alta productividad primaria de la región, cuyo efecto potenciador sobre las pesquerías pelágicas ha sido documentado, pero su efecto sobre comunidades litorales aún se está evaluando (Gallardo, 1975; Vásquez *et al.* 1998). En teoría, el afloramiento se puede presentar en toda la zona norte y central de Chile; pero ocurre en puntos específicos como puntas, cabos y bahías. La orientación de la costa y el régimen de vientos, en los que imperan los vientos del sur y suroeste, promueven los afloramientos debido a que desplazan las aguas superficiales (Bakun & Nelson, 1991; Fonseca & Farías, 1987). Sin embargo, esto puede resultar nocivo para las larvas descendientes de las especies litorales, ya que son desviadas de la costa quedando a la deriva mar adentro.

La presencia de las aguas frías de Humboldt junto al flujo sur-norte, son importantes en la distribución de las especies marinas chilenas, ya que permiten extender las condiciones frías más al norte. Se ha estimado que la temperatura del mar en el extremo norte es alrededor de 10 °C más baja que la esperada a similar latitud en otro continente y hacia el extremo sur 2 °C más alta; pero cerca de los 43° S no habría mayor diferencia. Este reducido gradiente térmico latitudinal, se considera una condición anómala general del sistema costero chileno (Viviani, 1979).

Frecuentemente se produce una anomalía oceanográfica y atmosférica asociada a la dinámica de la circulación atmosférica global, la Oscilación del Sur, cuyas fases positiva y negativa se asocian a los eventos de “El Niño” y “La Niña”. En “El Niño”, las aguas cálidas de la Corriente del Ecuador prevalecen



sobre la Corriente de Humboldt, elevándose la temperatura del agua, variando el nivel del mar y disminuyendo los niveles de nutrientes disponibles en la superficie del agua; con amplias repercusiones en la cadena trófica, en la comunidad bentónica, sistemas pelágicos y pesquería. Algunas especies locales proliferan, otras mueren y también se produce el ingreso de especies típicas de las aguas tropicales (Alamo & Bouchon, 1987; Tarazona *et al.* 1988; Escribano *et al.* 2004).

#### **I.4. Provincias biogeográficas**

La biogeografía marina está determinada en parte por el sistema de circulación de las aguas, siendo los gradientes térmicos los responsables fundamentales para el establecimiento de los organismos y en especial de los moluscos litorales en determinados lugares (Edmunds, 1977).

En América del Sur Occidental, se encuentra la región de agua Tropical del Pacífico y la región de aguas Templadas, cuyo límite de separación entre ambas estaría situado a la altura del Golfo de Guayaquil (3° - 4° S). La Región Oeste de Sudamérica o Región Templada del Pacífico Sur Oriental, comprende una biota con características temperadas y frías. En esta región se reconocen dos Provincias Biogeográficas con biotas diferentes en origen, constitución y distribución (Balech, 1954; Castilla, 1979).

Provincia Peruana o Peruano-Chilena: con extensión desde los 3° S - 4° S hasta aproximadamente 42° S (Isla de Chiloé), tiene una biota propia de la zona templada cálida con algunas especies tropicales o subtropicales que se distribuyen hasta Chile Norte o Chile Central.

Provincia Magallánica: abarca desde la Isla de Chiloé hasta el extremo Sur del Continente Sudamericano, comprende especies con características de zona templada fría (zonas frías o subantárticas).

La biota marina de estas dos provincias, principalmente la fauna, recibe el nombre de peruana o peruano-chilena y magallánica respectivamente. El análisis de distribución de diferentes especies de poríferos, equinodermos, isópodos, moluscos, crustáceos, e incluso algas ha permitido detectar para cada provincia algunos organismos endémicos y que los rangos de distribución de las especies son diferentes, existiendo una zona intermedia en la cual se superponen algunas de las especies de ambas provincias. Sin embargo, se ha constatado que existen grupos de especies endémicas de la provincia peruana que no penetran a la zona claramente magallánica y viceversa.

Lo anterior permitió definir una nueva Región Templada Transicional (Lancellotti & Vásquez, 1999) ubicada entre los 35° S y 48° S, área que posee características discretas en lo biótico y abiótico, y en la cual ocurre un gradual pero importante recambio de especies. El límite norte de la Región Templada Transicional coincide con el límite más austral de la Contracorriente Cálida del Perú alcanzado durante los eventos de “El Niño”. El sistema de Corrientes de Humboldt oscila a través de todo el tramo 35° S - 48° S en un ciclo verano – invierno. Todo esto le confiere a la Región Templada Transicional un ambiente abiótico discreto donde se observa un gradual reemplazo de especies más que un gran quiebre distribucional, y en la cual se encuentra la mayor diversidad de organismos (Lancellotti & Vásquez, 1999).

Recientemente Camus (2001) introdujo modificaciones a los patrones de distribución establecidos, enunciando una hipótesis complementaria y que no invalida las anteriores. En esta hipótesis se reconocen las siguientes unidades:

Provincia Peruana: comprendida desde los 18,4° S a 30° S.

Área intermedia: abarcaría desde el límite anterior a los 41° 43' S. En esta área, se distinguen tres distritos, de norte a sur: Septentrional, Mediterráneo y Meridional.

Provincia Magallánica: desde el límite anterior a los 56° S, con dos distritos: Austral y Subantártico.

Entre el área intermedia y la magallánica existe una zona de transición inducida, y entre la Provincia Peruana y el área intermedia una zona transicional de contacto.

### **1.5. Registros paleontológicos de moluscos**

Los estudios de paleontología realizados en Chile, han permitido registrar la presencia de varios grupos de organismos marinos desde la era Mesozoica. Sin embargo, algunos de los hallazgos que permiten dar testimonio de la existencia de moluscos y en particular de *Fissurella* que habitaron el mar chileno, han sido descritos en los siguientes depósitos de fósiles:

En el Norte de Chile (Antofagasta-Mejillones, 23° 06' S, 70° 27' W), Herm (1969) identificó fósiles de moluscos correspondientes a la época del Plioceno y a las especies de *Fissurella* las mencionó como “div. sp.”. Otra forma fósil, ha sido denominada *F. concolor* Philippi, 1887, la cual se asemeja a *F. maxima*. Otro resto incompleto se parecería a *F. crassa*. Para el Pleistoceno, mencionó a las especies *F. microtrema* (*F. peruviana*), *F. costata*, *F. crassa*, *F. lata* (*F. picta lata*) y *F. concina* (*F. maxima*) (McLean, 1984).

En el área de Caldera, entre los 27° S y Agua de los Burros 28° S aproximadamente (ca.), un análisis de estratigrafía permitió detectar los moluscos bivalvos *Ostrea* sp. y *Chlamys*, entre los elementos faunísticos del Oligoceno superior al Mioceno medio (Marquardt *et al.* 2000). Sin embargo, en esta misma área, el análisis de depósitos fosilíferos provenientes de 86 localidades permitieron identificar 54 especies de gasterópodos y 47 especies de bivalvos, con edad comprendida entre el Mioceno medio (16,4 – 11,2 millones de años) y el presente. Las edades se asignaron sobre la base de correlaciones con resultados radiogénicos e isótopos conocidos del

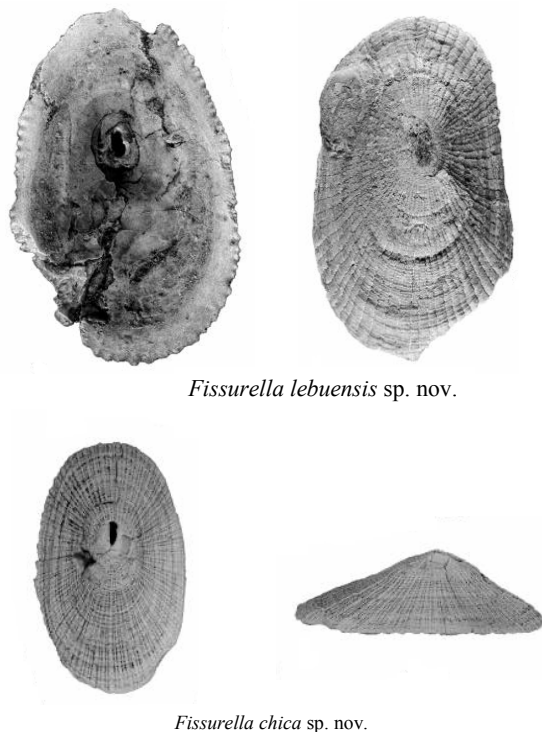
Cuaternario, datos micropaleontológicos de unidades neógenas y morfoestratigrafía local. Los depósitos asignados al Plioceno superior e inferior están formados por diversas especies de bivalvos y gasterópodos, entre los cuales no se registran fisurélidos. Entre las especies identificadas en los depósitos pleistocénicos se encuentran algunas de las actuales especies de *Fissurella* como *F. costata*, *F. latimarginata*, *F. maxima* y *F. peruviana*. En dichos yacimientos la presencia de algunas especies de bivalvos de aguas cálidas asociadas a otras de aguas frías, en algunos sitios permite asociarlos a un TAMA (Thermally Anomalous Molluscan Assemblages) alrededor del interglaciario 400.000 años antes del presente (AP), no obstante la fauna marina cuaternaria es similar a la actual (Guzmán *et al.* 2000).

En estudios de macrofauna y microfauna de moluscos en los alrededores de La Serena y Coquimbo (ca. 30° S), datados entre Plioceno y Pleistoceno temprano, no se mencionan registros de especies del género *Fissurella* (Griffin, 1999)

En las cercanías del pueblo Matanzas, Chile central (33° 57' S - 71° 52' W), se encuentran fósiles de moluscos pertenecientes al período del Mioceno inferior al Mioceno medio; entre los que hay 13 géneros de bivalvos y 40 especies de gasterópodos, y otros que habitaron la zona intermareal o submareal entre los que no figuran las especies de *Fissurella* (Frassinetti & Covacevich, 1993; Nielsen, 2003).

Respecto a la super familia Fissurelloidea, se registraron fósiles pertenecientes a la familia Diodoridae en las localidades de Pupuya (ca. 34° S y 71° 50' W), Punta Perro (33° 50' S - 71° 45' W) y Lebu (37° 35' S - 73° 45' W). Las especies identificadas son *Diodora fragilis*, *Diodora pupuyana*, *Diodora* sp.1 y *Diodora* sp.2, con edad correspondiente al Mioceno (Nielsen *et al.* 2004). Fósiles de dos especies del género *Fissurella* se colectaron en la localidad de Lebu, las que se denominaron *Fissurella lebuensis* y *Fissurella*

*chica* (Figura 3), con datación correspondiente a la época del Mioceno (Nielsen, 2003). De estas especies no hay registros actuales, por lo que es posible deducir que están extintas.



**Figura 3. Fósiles del Mioceno localizados en Chile Central (Lebu). Nielsen (2003).**

En materiales fósiles proveniente de Isla Ipún, ( $44^{\circ} 33' \text{ S} - 44^{\circ} 41' \text{ S}$ ,  $74^{\circ} 45' \text{ W}$ ) Archipiélago de los Chonos, sur de Chile, con una data aproximada a los períodos del Mioceno inferior al medio fueron reconocidas una especie de cefalópodo, 11 especies de bivalvos y 15 de gasterópodos. Sin embargo, entre todas las especies no figura ninguna del género *Fissurella* (Frassinetti, 2004). En la Isla Stokes, ubicada frente a Isla Ipún, el análisis de la fauna de moluscos fósiles, reveló 9 especies de bivalvos y 15 de gasterópodos, pertenecientes al

Mioceno inicial a medio, pero no hay registro de *Fissurella* (Frassinetti, 2001). En la misma zona sur de Chile, Isla Guafo (43° 37' S y 74° 45' W), situada al suroeste de Isla Grande de Chiloé, se recolectaron fósiles de moluscos que permitieron reconocer 16 especies de bivalvos y 18 especies de gasterópodos que estuvieron presentes durante el Plioceno superior. En similitud con los registros de las otras islas no hay fósiles de *Fissurella* (Frassinetti; 1997, 2000).

## **II. Antecedentes generales de los moluscos**

### **II.1. Filo Mollusca**

El filo Mollusca corresponde a uno de los dos grupos más numerosos y de mayor éxito evolutivo existente, lo cual ofrece una oportunidad favorable para conocer como las especies han logrado diversificarse morfológica y fisiológicamente para ocupar prácticamente todos los hábitats del planeta. Las especies existentes han entregado valiosa información para reconstruir su historia evolutiva mediante relaciones morfológicas y últimamente a través de los estudios moleculares.

*Fissurella* es uno de los géneros que comprende la familia Fissurellidae, la cual pertenece a la superfamilia Fissurelloidea, del subórden Vetigastropoda, de la clase Gastropoda, del filo Mollusca.

#### **II.1.A. Morfología y Sistemática**

El filo Mollusca es uno de los más antiguos, cuyos orígenes se remontan a unos 600 millones de años (Ma), durante el período Precámbrico. Aunque no hay consenso en el número total de especies, el filo Mollusca es el segundo grupo de mayor diversidad y cantidad de especies. Se estima que actualmente existen alrededor de 70.000 a 100.000 especies ocupando prácticamente todos los hábitats acuáticos y terrestres. Además, se postula que

un elevado número de especies que aún no han sido descritas se encuentran en las profundidades de los océanos polares y en aguas de las zonas tropicales (Margulis & Schwartz, 1988; Monge-Nájera, 2003).

El taxón Mollusca está constituido por diferentes Clases, las cuales incorporan organismos que han desarrollado una enorme diversidad de estructuras, morfología y tamaño corporal, variaciones estructurales y modificaciones funcionales de los órganos y sistemas, que les han permitido adaptarse a los diversos hábitats y ambientes de la tierra.

Los estudios anatómicos y de los caracteres morfológicos han abordado la totalidad de los órganos y sistemas de los moluscos (concha, estructuras respiratorias, estrategias reproductivas incluyendo gónadas y espermatozoides, rádula, corazón, órganos renales, sistema nervioso) cada uno de los cuales fue considerado por sus autores como un carácter de valor taxonómico para una adecuada clasificación (Beedham & Trueman, 1967; 1968; Emerson, 1962; Ghiselin, 1965; Graham, 1973).

Salvini-Plawen (1980, 1990), reconsideró los problemas sistemáticos y propuso una clasificación modificada de los moluscos a nivel de los taxa superiores. En su propuesta considera diversos caracteres tales como la organización original común de los moluscos y su posterior evolución, con predominancia en el manto, la cavidad del manto y sus órganos, la superficie de desplazamiento, el sistema muscular longitudinal y dorso-transversal, el sistema nervioso y órganos de los sentidos, la segmentación del huevo y tipo de larva. Además, se determinó que cada una de las categorías establecidas constituyen un grupo monofilético y que los moluscos evolucionaron a partir de un hipotético animal con una tipología similar a la de un gusano plano, acelomado, no segmentado, de muy pequeño tamaño (no superior a 5mm), que difiere del molusco ancestral que frecuentemente aparece en la literatura convencional (Salvini-Plawen, 1990).

No obstante, mediante el análisis del total de las secuencias de los nucleótidos del gen ARNr 28S se constató que el filo Mollusca no es un grupo monofilético, ya que incluiría invertebrados de otros Filos (especies de Braquiópodos, Nemertinos, Anélidos: Oligoquetos y Poliquetos; Equiuros y Pogonóforos). Del mismo modo, la clase bivalvos no mostró ser un grupo monofilético de especies (Winnepeninckx *et al.* 1996).

Recientemente, la comparación de un segmento de 1025 pb. del gen ARNr 28S de la especie *Laevipilina antarctica* (monoplacophora) con las de otros moluscos, ha permitido soportar la agrupación de monoplacóforos y placóforos en un solo grupo, generando nuevas interrogantes en la actual clasificación y modelo de evolución de los moluscos (Girebet *et al.* 2006).

La clasificación modificada de Salvini-Plawen (Salvini-Plawen, 1990), (Tabla 2) consideró los niveles taxonómicos superiores hasta el nivel de Orden, definiendo 8 clases de moluscos:

1. Clase Caudofoveata: son moluscos de cuerpo vermiforme cuya cutícula corporal posee placas de aragonita. Son marinos, viven entre 10 y 7.000 m de profundidad y están adaptados para excavar los sedimentos fangosos. En esta clase se agrupan entre 70 - 88 especies, las cuales presentan sexos separados, con una longitud corporal comprendida entre 2 mm – 14 cm. (Salvini-Plawen, 1990; Monge-Nájera, 2003).
2. Clase Solenogastres: poseen cuerpo cilíndrico angosto, cubierto por una cutícula incrustada con placas o espículas de aragonita y un pie estructurado para el deslizamiento. Son animales hermafroditas, de vida epibéntica. Viven en los mares a profundidades comprendidas entre los 5 y 6.850 m. Se reconocen 185 especies, que miden entre 0,8 mm y 30 cm de largo (Salvini-Plawen, 1990).
3. Clase Placophora: moluscos de cuerpo aplanado y amplio pie, cubierto con cutícula y espículas, dispuestas dorsalmente en 8 placas seriadas.



Se han identificado alrededor de 600 especies, que viven en ambientes marinos desde la superficie hasta los 7.000 m de profundidad y se alimentan de algas. La longitud del cuerpo es variable entre las especies, midiendo 3 mm las pequeñas y 43 cm las más grandes (Salvini-Plawen, 1990; Monge-Nájera, 2003).

4. Clase Tryblidia: cuerpo cubierto dorsalmente con una concha. Son animales marinos que viven en aguas profundas entre 175 y 6.500 m y se alimentan de detritus. Se han registrado de 12 a 15 especies, de tamaño pequeño comprendido entre 1,5 y 37 mm de longitud corporal.
5. Clase Bivalvia: moluscos que tienen el cuerpo comprimido lateralmente, protegido por una concha formada por dos valvas. Viven en los fondos acuáticos o bien adheridos a sustratos, hasta una profundidad de 10.700 m, capturando el alimento mediante un mecanismo de filtración. Las especies pueden ser hermafroditas o gonocóricas existiendo alrededor de 8.000 especies marinas y 2.000 límnicas, con un tamaño corporal de 1mm a 1,35 m (Salvini-Plawen, 1990; Monge-Nájera, 2003).
6. Clase Escaphopoda: esta clase comprende unas 350 especies, las cuales tienen el cuerpo protegido por una concha de forma cilíndrica. Son especies marinas excavadoras de los fondos blandos. Se encuentran hasta los 7.000 m y se alimentan de pequeños animales (Salvini-Plawen, 1990; Monge-Nájera, 2003).
7. Clase Siphonopoda: moluscos de cuerpo elongado dorso-ventralmente. Algunas especies poseen una concha de forma de espiral, pero la mayoría de las especies posee una concha en regresión o vestigio de ella. Poseen tentáculos cefálicos y el pie modificado para la propulsión, tipo tobera. Son especies carnívoras, cuyo cuerpo puede medir desde 1 cm a 8,0 m de largo. Se reconocen aproximadamente de 600 a 650

especies, todas marinas, de vida pelágica o bentónica, habitando desde la superficie hasta los 8.100 m de profundidad (Salvini-Plawen, 1990).

8. Clase Gastropoda: es la clase de moluscos más numerosa, representada por aproximadamente 40.000 especies poseedoras de una inmensa variabilidad morfológica y ecológica que le ha permitido colonizar todos los ambientes acuáticos y terrestres. El cuerpo de las especies mide entre 0,3 mm y 1,0 m de largo, protegido por una concha en espiral, aunque algunas especies carecen de ella (Salvini-Plawen, 1990; Monge-Nájera, 2003).

Sin embargo, aunque existe coincidencia en el uso del nombre para la mayoría de las clases; para otras aún coexisten más de una denominación, ya sea en los textos tradicionales como en los escritos específicos. Así es posible encontrar la Clase Aplacophora, que incluye como Subclases a la Clase Caudofoveata y a la Clase Solenogastres. La Clase Placophora con el nombre de Polyplacophora. La Clase Siphonophoda con la denominación de Clase Cephalophoda. La discrepancia entre los autores se acrecienta más a medida que se desciende en la jerarquía taxonómica. Las frecuentes revisiones que se hacen sobre determinados grupos han llevado a postular modificaciones de sus denominaciones y de su posición taxonómica o a suprimirlas y, en otras, a la reubicación de los organismos en jerarquías superiores o inferiores. Finalmente esto genera que en la literatura frecuentemente aparezca más de una denominación para referirse a un mismo grupo taxonómico o especie (entre otros: Letelier *et al.* 2003; Dayrat & Tillier, 2002; Lindberg & Ponder, 2001; Bieler, 1992; Healy, 1993; Lindner, 2000; Ruppert & Barnes, 1996).

**Tabla 2. Clasificación de los moluscos (\*). \*Salvini-Plawen, 1980 (+ = grupo extinguido)**

Phylum	<i>MOLLUSCA</i>	Cuvier, 1975
Subphylum	<i>SCUTOPODA</i>	Salvini – Plawen, 1978
Classis	<i>CAUDOFOVETA</i>	Boettger, 1893
Ordo	<b>Chaetodermatida</b>	Simroth, 1893
Subphylum	<i>ADENOPODA</i>	Salvini – Plawen, 1971
Infraphylum/Superclassis	<i>HETEROTECTA</i>	nov.
Classis	<i>SOLENOGASTRES</i>	Gegenbaur, 1878
Superordo	<b>Aplotegmentaria</b>	Salvini – Plawen, 1978
Ordo	<b>Pholidoskepia</b>	Salvini – Plawen, 1978
Ordo	<b>Neomeniomorpha</b>	Pelseneer, 1906 (emend.)
Superordo	<b>Pachytegmentaria</b>	Salvini – Plawen, 1978
Ordo	<b>Sterrofustia</b>	Salvini – Plawen, 1978
Ordo	<b>Cavibelonia</b>	Salvini – Plawen, 1978
Classis	<i>PLACOPHORA</i>	Ihering, 1876
+ Subclassis	<i>HEPTAPLACOTA</i>	nov
Ordo	<b>Septemchitonida</b>	Bergenhayn, 1955
Subclassis	<i>LORICATA</i>	Schumacher, 1817
+ Ordo	<b>Chelodida</b>	Bergenhayn, 1955
+ Ordo	<b>Scanochitonida</b>	Starobogatov & Sirenko, 1975
Ordo	<b>Lepidopleurida</b>	Thiele, 1910
Ordo	<b>Chitonida</b>	Thiele, 1910
Infraphylum/Superclassis	<i>CONCHIFERA</i>	Gegenbaur, 1878
Classis	<i>GALEROCONCHA</i>	nov.
Ordo	<b>Tryblidiida</b>	Wenz, 1938 = <b>Monoplacophora</b> Odhner in Wenz, 1940
+ Ordo	<b>Bellerephontida</b>	Ulrich & Scofield, 1897 = <b>Belleromorpha</b> Naef, 1911
Classis	<i>GASTROPODA</i>	Cuvier, 1795
Subclassis	<i>PROSOBRANCHIA</i>	Milne- Edwards, 1848
Ordo	<b>Archaeogastropoda</b>	Thiele, 1925
Subordo	<i>Vetigastropoda</i>	nov.
Subordo	<i>Docoglossa</i>	Troschel, 1866
Subordo	<i>Neritopsina</i>	Cox, 1960
Ordo	<b>Caenogastropoda</b>	Cox, 1960
Subordo	<i>Mesogastropoda</i>	Thiele, 1925
Subordo	<i>Neogastropoda</i>	Thiele, 1929
Subclassis	<i>PULMONATA</i>	Cuvier, 1817
Ordo	<b>Archaeopulmonata</b>	Morton, 1955
Ordo	<b>Basommatophora</b>	Keferstein, 1864
Ordo	<b>Stylommatophora</b>	Schmidt, 1855
Subclassis	<i>GYMNOMORPHA</i>	Salvini-Plawen, 1970
Ordo	<b>Onchidiida</b>	Rafinesqui, 1815
Ordo	<b>Soleolifera</b>	Simroth, 1908 = <b>Veronicellida</b> Gray, 1840
Ordo	<b>Rhodopida</b>	Fischer, 1883
Subclassis	<i>OPISTHOBRANCHIA</i>	Milne-Edwards, 1848
Ordo	<b>Pyramidellimorpha</b>	Fretter, 1979
Ordo	<b>Cephalaspidea</b>	Fischer, 1883
Ordo	<b>Anaspidea</b>	Fischer, 1883
Ordo	<b>Saccoglossa</b>	Ihering, 1876 (= <i>Ascoglossa</i> Bergh, 1879)

- Ordo **Notaspidea** Fischer, 1883
- Ordo **Nudibranchia** Ducrotay-Blainville, 1814
- Ordo **Anthobranchia** Férussac, 1819
- Classis **BIVALVIA** Linné, 1756
  - Subclassis **PELECYPODA** Goldfusz, 1820
    - Superordo **Ctenidiobranchia** nov.
    - Ordo **Nuculida** Dall, 1899
    - Superordo **Palaeobranchia** Iredale, 1939
      - Ordo **Solemyda** Dall, 1889
    - + Ordo **Praecardiida** Newell, 1965
      - Superordo **Autobranchia** Nevesskaya et al., 1971
        - Ordo **Pteriomorpha** Beurlen, 1944
        - Ordo **Palaeoheterodonta** Newell, 1965
        - Ordo **Heterodonta** Neumayr, 1883
        - Ordo **Anomalodesmata** Dall, 1889
      - Superordo **Septibranchia** Pelseneer, 1888/1906
        - Ordo **Poromyida** Ridewood, 1903
    - + Subclassis **ROSTROCONCHIA** Cox, 1960
      - Ordo **Ribeiriida** Kobayashi, 1933
      - Ordo **Ischyriniida** Pojeta & Runnegar, 1976
      - Ordo **Conocardiida** Neumayr, 1891
  - Classis **SCAPHOPODA** Bronn, 1862
    - Ordo **Dentaliida** Palmer, 1974
    - Ordo **Siphonodentaliida** Palmer, 1974
  - Classis **SIPHONOPODA** Lankester, 1877 = **CEPHALOPODA** Schneider, 1784
    - + Subclassis **ORTHOCERATOIDA** Kuhn, 1940
      - Ordo **Ellesmerocerida** Flower, 1950
      - Ordo **Orthocerida** Kuhn, 1940
      - Ordo **Ascocerida** Kuhn, 1949
      - Ordo **Discosorida** Flower, 1950
      - Ordo **Endocerida** Teichert, 1933
      - Ordo **Actinocerida** Teichert, 1933
    - Subclassis **NAUTILOIDA** Lamarck, 1812
      - + Ordo **Oncocerida** Flower, 1950
        - Ordo **Nautilida** Agassiz, 1847
      - + Ordo **Tarphycerida** Flower, 1950
    - + Subclassis **AMMONOIDA** Lamarck, 1812
      - Ordo **Bactritida** Shimanskij, 1951
      - Ordo **Goniatitida** Hyatt, 1884
      - + Ordo **Ammonitida** Agassiz, 1847
    - Subclassis **COLEOIDA** Bather, 1888
      - + Ordo **Aulacocerida** Jeletzky, 1965
      - + Ordo **Belemnitida** Zittel, 1885
        - Ordo **Sepiida** Naef, 1916
      - + Ordo **Phragmoteuthida** Jeletzky, 1964
        - Ordo **Teuthida** Naef, 1916
        - Ordo **Vampyromorpha** Grimpe, 1917
        - Ordo **Octobranchia** Boettger, 1952 (pro **Octopoda** Leach, 1817)

Adicionalmente, la reciente incorporación de la biología molecular en los estudios taxonómicos aumenta las incongruencias ya existentes, porque no siempre se alcanza una coincidencia absoluta entre la filogenia tradicional (inferida en base a los caracteres ontológicos y morfológicos) y la moderna (que emplea las técnicas moleculares). Como corolario, no resulta inadecuado destacar que actualmente no existe un acuerdo universal para generar la escala que mejor represente el sistema natural de clasificación de las especies, su taxonomía y sus relaciones filogenéticas.

## **II.2. Clase Gastropoda**

### **II.2.A. Morfología**

Corresponde a la clase más exitosa de los moluscos y se estima que emergieron en el Cámbrico hace 550 Ma. Tuvieron una rápida radiación colonizando exitosamente todos los ambientes del planeta, para lo cual han desarrollado diversos cambios morfológicos corporales y funcionales de sus sistemas que les ha permitido utilizar óptimamente el espacio abiótico y los diferentes sistemas tróficos, siendo actualmente la clase más numerosa entre los moluscos (Haszprunar, 1988; Bieler, 1992).

Una de las características distintivas de los gasterópodos es la presencia de una concha enroscada localizada dorsalmente, pero en las especies más recientes ha desaparecido (opistobranquios y babosas terrestres). Esta estructura ha sido utilizada mayoritariamente en la clasificación y taxonomía de los gasterópodos y además dadas sus características químicas ha permanecido o servido como modelo para la formación de fósiles, testimonio ampliamente utilizado para estimar el tiempo de origen y posterior evolución de ellos (Clarkson, 1986).

La concha tiene una morfología variable distinguiéndose los tipos: turbinaza, globosa, oval invertida, trocoide, cilíndrica, buloide, bicónica, turriforme, lenticular, pateliforme (Guzmán *et al.* 1998; Aldea & Valdovinos, 2005). La concha protege al animal de las fuerzas físicas del entorno, predadores y de la desecación, estando formada por cristales de carbonato de calcio depositado sobre una matriz proteica, que se distribuyen en diferentes láminas las que a su vez forman capas. La síntesis orgánica de la concha implica una alta demanda energética, equivalente al 60% de la energía ingerida por el animal, superior a la que destina a la formación de gametos (Palmer, 1992).

Otra característica relevante de los gasterópodos es la torsión corporal que ocurre durante el desarrollo larval, desplazándose la masa visceral en 180° (sentido contrario al reloj) respecto de la cabeza, pasando de una simetría bilateral a una asimetría bilateral. Este desplazamiento promueve la atrofia de uno de los órganos pares, la torsión del aparato digestivo y cordones nerviosos. El ano, nefridioporo y gonoporo quedan en posición anterior, próximos a la cabeza, y evacuan en la cavidad del manto.

El proceso de atrofia de los órganos presenta algunas características propias para algunos grupos de gasterópodos. En Vetigastropodos (Fissurellidae, Haliotidae), durante el desarrollo embrionario del sistema renogenital, se produce en primera instancia la atrofia y pérdida de la gónada izquierda con su respectivo gonoducto y posteriormente la pérdida del nefridio izquierdo. En Patellogastropoda se produce una unión entre la gónada y nefridio izquierdo. En Caenogastropoda se atrofia el nefridio derecho y la gónada izquierda. Estos aspectos del desarrollo marcan la tendencia evolutiva característica de cada grupo de gasterópodos, pero ha sido pocas veces considerado en las reconstrucciones de filogenia aunque fue descrito por Meyer en 1913 (Lindberg & Matzen, 2004).

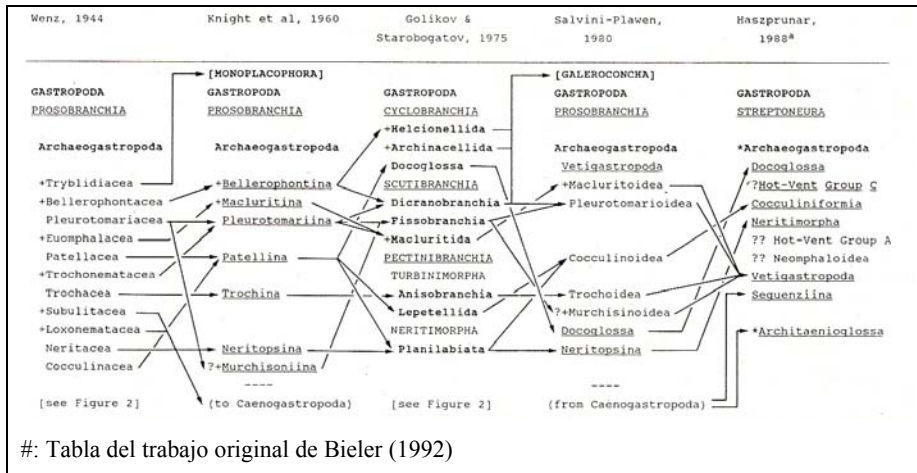
## **II.2.B. Sistemática y filogenia de gasterópodos**

Los primeros estudios sistemáticos de los gasterópodos se fundamentaron en la forma, coloración y escultura de la concha. Luego, con el conocimiento de las estructuras internas, se establecieron nuevos grupos como Prosobranquios-Opistobranquios (según posición de las branquias), Monotocardia-Diotocardia (número de aurículas), Streptoneura-Euthyneura (sistema nervioso), Gymnobranquia (morfología de las branquias), Pleurognatha (morfología bucal), Androgyna (anatomía sistema reproductor), etc.

Tradicionalmente los gasterópodos han sido divididos en las Subclases Prosobranchia, Opistobranchia y Pulmonata, reflejando la evolución de las estructuras respiratorias. Los Prosobranquios se dividieron en Archaeogastropoda, Mesogastropoda y Neogastropoda, en correspondencia a su origen y/o radiación con la era Paleozoica, Mesozoica y Cenozoica respectivamente. Posteriormente Mesogastropoda y Neogastropoda se agruparon en la categoría de Caenogastropoda.

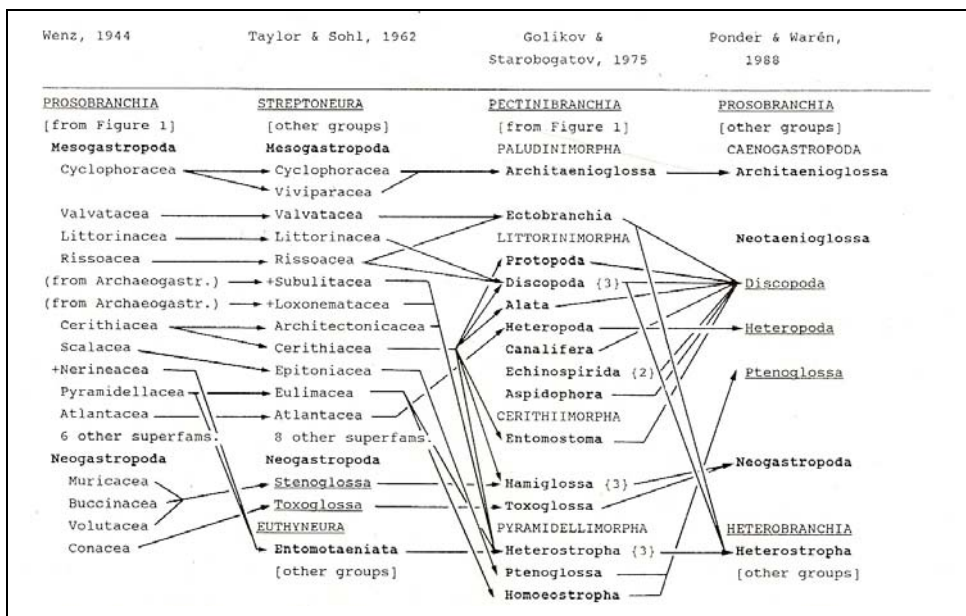
Consecutivamente, se han incorporado nuevas denominaciones y suprimido otras, al igual que se han cambiado de jerarquía algunos grupos. Lo anterior quedó estructurado en la clasificación de Thiele (1929-1931), pero posteriormente se fue modificando debido a la inconsistencia de algunos grupos definidos, cuyos miembros componentes presentaban variaciones respecto del patrón del carácter taxonómico empleado. Además, los estudios morfológicos, inclusive hasta con microscopía electrónica y datos fósiles, proporcionaron nuevas evidencias para la comprensión de las relaciones filogenéticas.

**Tabla 3. Clasificaciones de Archaeogastropoda. Bieler (1992)<sup>#</sup> (+: indica taxa extinguida; \*: taxa que fueron marcadas como parafiléticas; ? ubicado como en el original).**



#. Tabla del trabajo original de Bieler (1992)

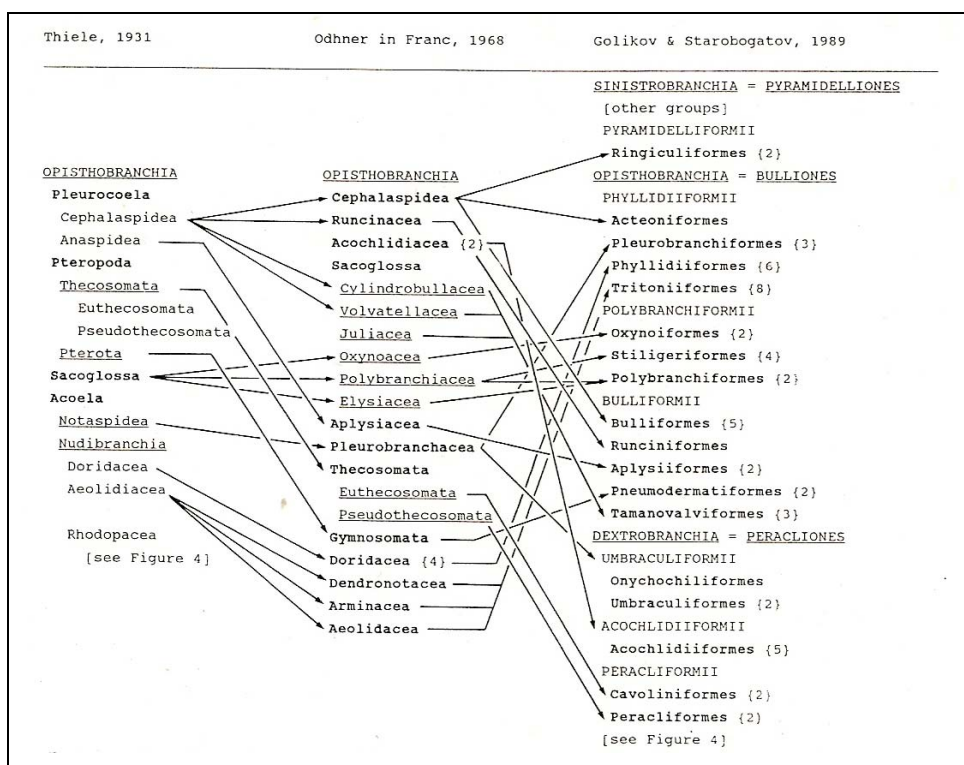
**Tabla 4. Clasificaciones de Caenogastropoda/Heterostropha. Bieler (1992)<sup>#</sup>. Los números entre paréntesis indican el número de los subórdenes incluidos.**





Bieler (1992) resumió las modificaciones que fueron realizadas a la clasificación original de Thiele por los autores Wenz, 1994; Knight *et al.* 1960; Taylor & Sohl, 1962; Odhner in Franc, 1968; Galikov & Starobogatov, 1975, 1989; Solem 1978; Hubendick, 1978; Salvini-Plawen, 1980; Tillier, 1984, 1989; Haszprunar, 1988; Ponder & Warén 1988. Estas clasificaciones se muestran en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5 y Tabla 6.

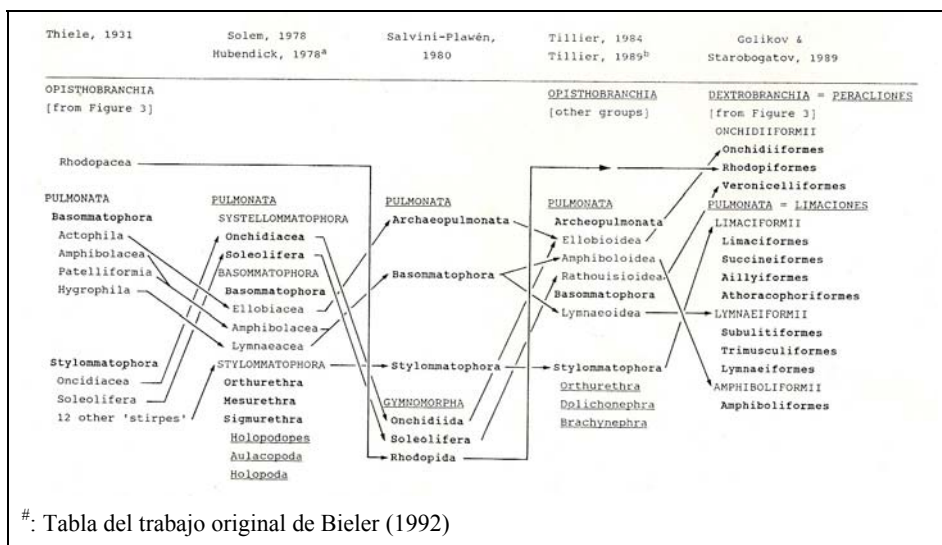
**Tabla 5. Clasificaciones de Opisthobranchia. Bieler (1992)<sup>#</sup>. Los números entre paréntesis indican el número de los subórdenes incluidos**



En la última década, Ponder & Lindberg (1997) establecieron las subclases Eogastropoda y Orthogastropoda. Para ello consideraron que Patellogastropoda posee grandes diferencias anatómicas y morfológicas con el

resto de los gasterópodos, y por lo tanto, debieran estar en el grupo Eogastropoda, y todos los demás gasterópodos en la subclase Orthogastropoda. Incluso se ha postulado que Patellogastropoda podría ser considerado un grupo independiente de los gasterópodos (Harasewich & McArthur, 2000).

**Tabla 6. Clasificaciones de Pulmonata. Bieler (1992)<sup>#</sup>.**



Por el contrario, mediante análisis filogenético realizado con secuencias de un segmento del gen ADNr 18S, se infiere que no es posible sustentar la subclase Eogastropoda, aunque Patellogastropoda sí constituye un grupo monofilético (Harasewich & McArthur, 2000).

En la misma línea de evidencias, las relaciones filogenéticas establecidas considerando la secuencia completa del gen ARNr 18S, no proporcionaron soporte estadístico que permitan sustentar la monofilia de los gasterópodos, destacando que los prosobranquios no se asocian en un solo grupo a diferencia de Euthyneura (Opisthobranquios y Pulmonados) y Caenogastropoda (Meso y Neogastropoda), grupos en donde las especies se

agrupan monofiléticamente; además el antiguo grupo Archaeogastropoda (Prosobranquia), incluye a Neritomorfos y Vetigastropodos (Winnepenninckx *et al.* 1996, 1998).

La reconstrucción filogenética usando el gen ADNr 18S también permite confirmar la monofilia de Apogastropoda y de sus grupos Heterobranchia y Caenogastropoda. Además, con secuencias del gen Citocromo oxidasa subunidad 1, las relaciones entre representantes de las familias del antiguamente denominado grupo Neogastropodos, respaldan la monofilia de este grupo, así como también la monofilia de Caenogastropodos y la de los Heterobranquios con sus respectivos sub grupos Opistobranquios y Pulmonados (Harasewych *et al.* 1997; Remigio & Hebert, 2003).

### **II.3. Sistemática y filogenia de Vetigastropoda**

El suborden Vetigastropoda Salvini-Plawen, 1980 es una de las categorías con aceptación generalizada dentro de los gasterópodos, pero el número de taxones y el de especies comprendidos aún no se ha establecido con exactitud.

Es un grupo muy numeroso que reúne a las especies asignadas por Thiele al grupo de Archaeogastropoda. Entre las superfamilias, se han considerado las siguientes: Pleurotomarioidea, Fissurelloidea, Trochoidea, Lepetodrilioidea Scissurelloidea y Haliotiidea (Haszprunar, 1988), pero en Lindner (2000) las dos últimas han sido consideradas en la categoría de familia y junto con Pleurotomarioidea son agrupadas en la Superfamilia Pleurotomarioidea y además se incorpora a la superfamilia Seguenzioidea. En correspondencia con lo anterior, pareciera existir consenso en que las familias Pleurotomariidae, Fissurellidae, Trochidae, Haliotidae, Scissurellidae, Seguenziidae y Lepetodrilidae, corresponden al grupo de Vetigastropoda.

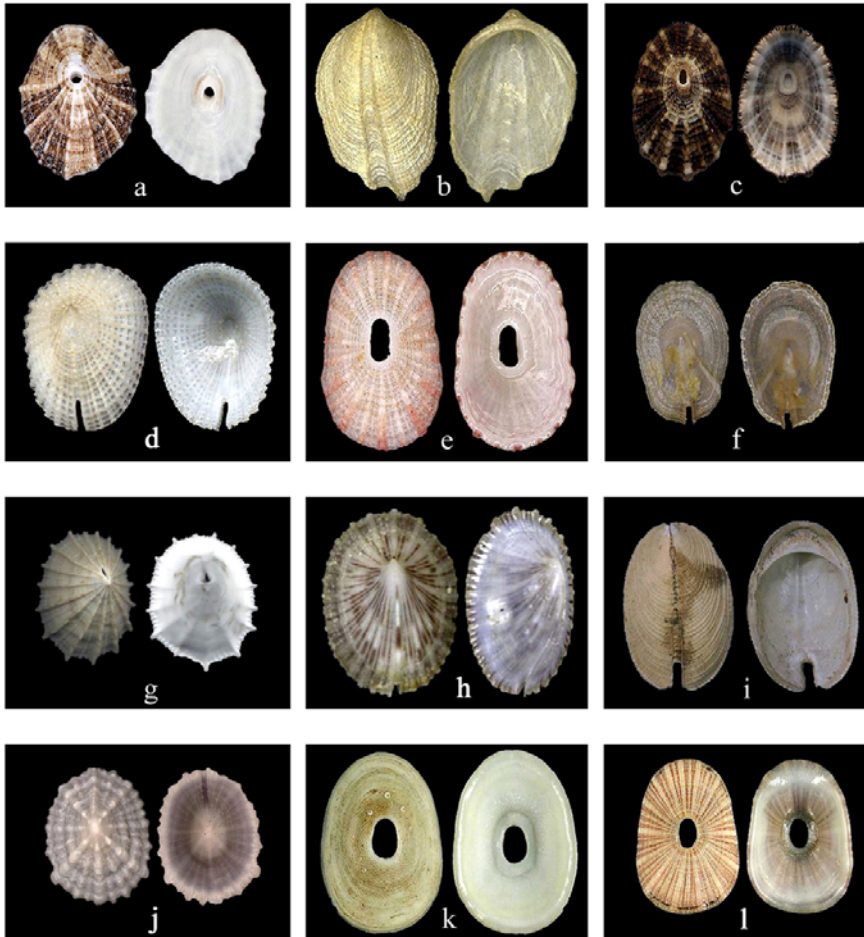
Adicionalmente, han sido mencionadas como parte del grupo Vetigastropoda las familias Neomphalidae, Peltospiridae, Anatomidae, Clypeosectidae, Lepetellidae, Phasianellidae, Stomatellidae, Sutilizonidae, Turbinidae, Gorgoleptidae, Pendromidae, Skeneidae, Trochaclididae, Cocculinidae. La mención de esta última familia es sorprendente porque es reconocida su posición en el superorden Cocculiniformia (Lindner, 2000; Lindberg & Ponder, 2001; Geiger & Thacker, 2005).

Se considera, como carácter distintivo del grupo, la presencia de las estructuras sensoriales denominadas “bursículos ctenidiales”. Estos bursículos han sido identificados en algunos especímenes de Pleurotomariidae, pero no en los organismos de la familia Lepetodrilidae y Neomphalidae. Las especies de la familia Cocculinidae carecen de branquias y en consecuencia no tienen las estructuras sensoriales y su posición dentro de Vetigastropoda es incierta (Ponder & Lindberg, 1997; Haszprunar, 1987; Sasaki, 1998, Voltzow *et al.* 2004). Diferentes caracteres morfológicos estructurales, han servido para estudiar la evolución de este grupo y de los gasterópodos. La más reciente hipótesis de filogenia considerando la cavidad paleal y sus estructuras, ha permitido inferir una asociación en monofilia de Vetigastropoda, (específicamente en base a las familias Pleurotomariidae, Fissurellidae, Trochidae, Haliotidae y Scissurellidae), y que cada familia es monofilética. La familia Fissurellidae y Scissurellidae se ubican en la posición basal de Vetigastropoda, en tanto que Trochidae se agrupa con Haliotidae en clado de monofilia y es el último en emerger a partir de un nodo común con Pleurotomariidae (Ponder & Lindberg, 1997). Sin embargo, los pleurotomaridos se consideran los gasterópodos más primitivos, porque poseen una rádula que tiene muy poco en común con los últimos gasterópodos fósiles, una concha enroscada asimétrica y presencia de órganos pares en la cavidad paleal (Golikov & Starobogatov, 1975; Taylor & Sohl, 1962).

Por otra parte, los análisis de filogenia molecular en base a secuencias de uno o varios genes han sido antagónicos. En árboles obtenidos con secuencias de todo el gen nuclear ADNr 18S, las superfamilias del suborden Vetigastropoda (Pleurotomarioidea, Fissurelloidea, Haliotoidea y Trochoidea) forman unidades monofiléticas. La unidad Pleurotomarioidea es la más basal y se separa de todas las demás a partir de un nodo común. Con posterioridad Haliotoidea y Trochoidea emergen como clados hermanos, dejando a Fissurelloidea en una posición inferior (Yoon & Kim, 2005). La relación de unidades hermanas entre Trochoidea y Haliotoidea también fue inferida en base a secuencias de un segmento del gen ADNr 28S y ambas se separan de Fissurelloidea. Estas tres unidades taxonómicas se asocian en monofilia, constituyendo el clado Vetigastropoda (Harasewych & McArthur, 2000). Además, la asociación de los vetigastropodos en un clado monofilético se detectó desde secuenciaciones provenientes de los genes histona H3, citocromo oxidasa subunidad 1 y dos segmentos de ARNr 18S. Los organismos de Pleurotomariidae, Haliotidae, Lepetodrolidae, Scissurellidae, y Fissurellidae se relacionan constituyendo las respectivas unidades monofiléticas de cada familia. Pleurotomariidae aparece como un grupo basal a partir del cual emergen los otros clados. El clado que ocupa la posición superior del árbol es Fissurellidae y podría ser considerado como el grupo más reciente de vetigastropodos (Geiger & Thacker, 2005). Por el contrario, la agrupación en monofilia no se ha constatado en estudios realizados con secuenciaciones de dos segmentos del gen ADNr 28S y uno de histona H3, ni utilizando los segmentos de cuatro genes (tres de ADNr 28S, histona H3, Citocromo oxidasa subunidad 1 y el pequeño nuclear ARN U2), debido a que Vetigastropoda puede formar dos agrupaciones y además establecer relaciones con otros grupos de invertebrados (Colgan *et al.* 2003, 2000).

## II.4. Superfamilia Fissurelloidea

### II.4.A. Morfología



**Figura 4. Imágenes de conchas de diferentes géneros de la familia Fissurellidae.**

- |                                      |                                 |                                   |
|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| a: <i>Medusafissurella salebroso</i> | b: <i>Nesta galapagensis</i>    | c: <i>Diodora graeca</i>          |
| d: <i>Emarginella hizardi</i>        | e: <i>Lucapinella limatula</i>  | f: <i>Laeviemarginula kimberi</i> |
| g: <i>Puncturella cuculata</i>       | h: <i>Emarginula variegata</i>  | i: <i>Zeidora tasmanica</i>       |
| j: <i>Hemitoma octoradiata</i>       | k: <i>Cosmetalepas africana</i> | l: <i>Amblychilepas scutella</i>  |

Los organismos de esta superfamilia poseen una concha dorsal tipo pateliforme con una abertura para el flujo del agua exhalante. La abertura es de

varias formas y ocupa posiciones diferentes en la concha. Esta abertura puede ser una hendidura de extensión variable en el margen anterior de la concha, corresponder a un débil levantamiento al frente de la concha o bien un orificio en el ápice de la concha.

También, en algunas especies en el lado interior de la concha desde el orificio se proyecta una lámina o septo vertical que la divide parcialmente en una pseudocámara anterior y posterior, o en otras se forma una placa horizontal. Estos aspectos estructurales de la concha son caracteres ampliamente considerados para definir el género (Figura 4).

El cuerpo es simétrico, pero el manto y vísceras están torcidos. La concha no tiene enroscamiento y es bilateralmente simétrica. La simetría es una condición adquirida secundariamente después de la torsión, ya que durante su vida larvaria presentan una concha enroscada y plano de asimetría.

Esta superfamilia está formada por cerca de 610 especies. Es el segundo grupo más numeroso contribuyendo con un 31% de especies al superorden Vetigastropoda, siendo superada solamente por Trochoidea que aporta un 50% de especies.

#### **II.4.B. Sistemática**

En la sistemática de Fissurelloidea existen algunas discrepancias entre los autores para establecer las denominaciones de las categorías comprendidas desde las familias hasta el género, como se puede constatar en la Tabla 7.

Es frecuente que todos los géneros se mencionen adscritos a la familia Fissurellidae, en la que algunos géneros están representados por pocas especies y otros han logrado una mayor diversificación.

**Tabla 7. Sistemática de Fissurellidae. Vaught (1989) y Lindner (2000).**

Referencia:	Vaught, 1989	Lindner 2000
<b>SUPERFAMILIA:</b>	Fissurelloidea Flemming, 1822	Fissurelloidea Flemming, 1822
<b>FAMILIA:</b> -----		Clypeosectidae McLean, 1989
Género: -----		<i>Clypeosectus</i> McLean, 1989
Género: -----		<i>Pseudorimula</i> McLean, 1989
<b>FAMILIA:</b>	Fissurellidae Flemming, 1822	Fissurellidae Flemming, 1822
<b>Subfamilia:</b> -----		Scutinae Christians, 1973
Género: -----		<i>Scutus</i> Montfort, 1810
Subgénero:		<i>Nannoscutum</i> Iredale, 1937
<b>Subfamilia:</b> -----		Hemitominae Kuroda, Habe &
Oyama 1971		
Género: -----		<i>Hemitoma</i> Swainson, 1840
Subgéneros: -----		<i>Montfortia</i> Recluz, 1843
-----		<i>Montfortista</i> Iredale, 1929
<b>Subfamilia:</b>	Fissurellinae Flemming, 1822	Fissurellinae Flemming, 1822
Género: <i>Fissurella</i> Brugiere, 1789		Mantiene categoría
Subgéneros: <i>Clypidella</i> Swainson, 1840		Mantiene categoría
<i>Cremides</i> H. & A. Adams, 1854		Mantiene categoría
Género: <i>Amblychilepas</i> Pilsbry, 1890		Mantiene categoría
Género: <i>Cosmetalepas</i> Iredale, 1924		Mantiene categoría
Género: <i>Dendrofissurella</i> McLean & Kilburn, 1986		Mantiene categoría
Género: <i>Makroschisma</i> Sowerby, 1839		Mantiene categoría
Subgéneros: <i>Dolichischisma</i> Iredale, 1940		Mantiene categoría
<i>Foralepas</i> Iredale, 1940		Mantiene categoría
Género: <i>Medusafissurella</i> McLean & Kilburn, 1986		Mantiene categoría
Género: <i>Montfortula</i> Iredale, 1915		Subgénero de <i>Clypidina</i>
Género: <i>Montfortulana</i> Habe, 1961		Subgénero de <i>Clypidina</i>
Género: <i>Lucapina</i> Sowerby, 1835		Género de Fissurellidin
<b>Subfamilia:</b>	Diodorinae Wenz, 1938	Diodorinae Wenz, 1938
Género: <i>Diodora</i> J.E. Gray, 1821		Mantiene categoría
Subgéneros: -----		<i>Atractotrema</i> Cossmann, 1888
<i>Austroglyphis</i> Cotton & Godfrey, 1934		Mantiene categoría
<i>Elegidion</i> Iredale, 1924		Mantiene categoría
<i>Fissuridea</i> Swainson, 1840		Mantiene categoría
Género: <i>Megathura</i> Pilsbry, 1890		Mantiene categoría
Género: <i>Stromboli</i> Berry, 1954		Mantiene categoría
<b>Subfamilia:</b>	Fissurellidinae Pilsbry, 1890	Fissurellidinae Pilsbry, 1890
Género: <i>Fissurellidea</i> D'Orbigny, 1841		Mantiene categoría
(sin. <i>Megatebennus</i> Pilsbry, 1890)		-----
Género: <i>Leurolepas</i> McLean, 1970		Mantiene categoría
Género: De familia Fissurellidae		<i>Lucapina</i> Sowerby, 1835
Género: <i>Lucapinella</i> Pilsbry, 1890		-----
Género: <i>Pupillaea</i> Gray in Sowerby, 1835		-----
Género: <i>Buchanania</i> Lesson, 1830		-----



<b>Subfamilia:</b> Emarginulinae J.E. Gray, 1834	Emarginulinae J.E. Gray, 1834
Género: <i>Emarginula</i> Lamarck, 1801	Mantiene categoría
Subgéneros: -----	<i>Notomella</i> Cottton, 1957
<i>Semperia</i> Crosse, 1867	Mantiene categoría
<i>Subzeidora</i> Iredale, 1924	Mantiene categoría
Género: <i>Clypidina</i> J.E. Gray, 1847	Mantiene categoría
Subgéneros: -----	<i>Montfortula</i> Iredale, 1915
-----	<i>Montfortulana</i> Habe, 1961
Género: <i>Emarginella</i> Pilsbry, 1891	Mantiene categoría
Género: <i>Fissuripepta</i> G. Seguenza, 1862	Mantiene categoría
Género: <i>Hemitoma</i> Swainson, 1840	-----
Subgéneros: <i>Montfortia</i> , Réc Luz, 1843	-----
<i>Montfortista</i> Iredale, 1929	-----
Género: <i>Laeviemarginula</i> Habe in Kuroda, 1953	Mantiene categoría
Género: <i>Nesta</i> H.Adams, 1870	Mantiene categoría
Sugénero: <i>Laevinesta</i> Pilsbry & McGinty, 1952	-----
Género: <i>Entomella</i> Cotton, 1945	-----
Género: <i>Notomella</i> Cotton, 1957	Mantiene categoría
Género: <i>Puncturella</i> Lowe, 1827	Mantiene categoría
Subgéneros: <i>Cranopsis</i> A. Adams, 1860	Mantiene categoría
<i>Rimulanax</i> Iredale, 1924	Mantiene categoría
<i>Rixa</i> Iredale, 1924	Mantiene categoría
<i>Vacerrena</i> Iredale, 1958	Mantiene categoría
Género: <i>Rimula</i> Defrance, 1827	Mantiene categoría
Género: -----	<i>Scelidotoma</i> McLean, 1966
Género: <i>Scutus</i> Monfort, 1810	-----
Subgénero. <i>Nannoscutum</i> Iredale, 1937	-----
Género: <i>Tugali</i> J.E. Gray, 1843	Mantiene categoría
Subgéneros: <i>Parmophoridea</i> Wenz, 1938	-----
<i>Tugalina</i> Habe in Kuroda, 1953	-----
Género: <i>Zeidora</i> A. Adams, 1860	Mantiene categoría
Nota: A diferencia de lo anterior, McLean, (1984) considera a Fissurellidae conformado por las subfamilias Emarginulinae y Fissurellinae y en el género <i>Fissurella</i> distingue los subgéneros <i>Fissurella</i> y <i>Cremides</i> .	

Las aproximadamente 600 especies quedan circunscritas mayoritariamente a cuatro géneros: *Diodora* 20%, *Emarginula* 19%, *Fissurella* 14% y *Puncturella* un 13% de las especies. Los géneros *Megathura*, *Laeviemarginula*, *Lucapinella*, *Nesta* comprenden menos del 3% del total y los otros géneros, porcentajes inferiores al 2% de las especies (Millard, 1997; bases on line: ANSP; SOMBASE; Western Atlantic Gastropod Database).

#### II.4.C. Filogenia

Los escasos estudios de biología molecular han coincidido en evidenciar que los representantes de los grupos analizados se relacionan formando una agrupación única, destacando el estado monofilético de Fissurelloidea.

El análisis de las secuencias del gen completo ADNr 18S, entre ejemplares de tres géneros de la familia Fissurellidae, mostró que el género *Tugali* es el antecesor de *Diodora* y *Macroschisma*, originándose ambos de un nodo común. No obstante, considerando las secuencias obtenidas de los fragmentos histona H3, Citocromo oxidasa 1 y dos del ARNr 18S, se ha inferido que *Diodora* forma un grupo basal, del cual irradian *Fissurella* y *Emarginula*. Posteriormente, desde *Emarginula* emergen, desde un nodo común, la rama de *Scutus* y la de *Monfortula* (Yoon & Kim, 2005; Geiger & Thacker, 2005).

### III. El género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental

#### III.1. Sistemática y clasificación

Del total de las especies existentes incluidas en el género *Fissurella*, el 20% vive en la plataforma continental del Pacífico Sudoriental, distribuyéndose desde Perú (6° S) hasta el Sur de Chile (55° S).

Las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental han sido históricamente clasificadas considerando preferentemente los caracteres morfológicos y patrón de diseño de la concha. Esta clasificación tipológica propició que, en asociación a las descripciones de nuevos organismos, provenientes o no de una misma zona, emergieran nuevas denominaciones y a la vez que cada cierto tiempo fueran sometidas a revisiones para evaluar y resumir el estado nominal. Sin embargo, al mismo tiempo se proponían nuevos

nombres específicos, ya sea para sustituir a los preestablecidos o para denominar a aquellas que no coincidían con el holotipo de la especie previamente descrito.

**Tabla 8. Denominación actual de las especies del subgénero *Fissurella*. Nombres anteriores y provincia biogeográfica a la que pertenecen. Nómina elaborada en base a la lista publicada por McLean, 1984.**

NOMBRE ACTUAL	NOMBRES ANTERIORES	PROVINCIA
<i>F. bridgesii</i> Reeve, 1849		Peruana
<i>F. costata</i> Lesson, 1831	<i>F. rudis</i> Deshayes, 1830, not Roeding, 1798 <i>F. chilensis</i> Sowerby, 1835 <i>F. rubra, costata</i> var., Ziegnhom and Thiem, 1925	Peruana
<i>F. crassa</i> Lamarck, 1822	<i>F. depressa</i> Lamarck, 1822 <i>F. clypeiformis</i> Sowerby, 1825	Peruana
<i>F. cumingi</i> Reeve, 1849	<i>F. stellata</i> Reeve, 1850 <i>F. latimarginata</i> var. <i>cumingi</i> , Pilsbry, 1890	Peruana
<i>F. latimarginata</i> Sowerby, 1835	<i>F. biradiata</i> Sowerby, 1835 <i>F. bella</i> Reeve, 1849 <i>F. galericulum</i> Reeve, 1850 <i>F. punctatissima</i> Pilsbry, 1890	Peruana
<i>F. limbata</i> Sowerby, 1835	<i>F. multilineata, limbata</i> var., Ziegenhorn and Thiem 1925	Peruana
<i>F. maxima</i> Sowerby, 1835	<i>F. solida</i> Philippi, 1845 <i>F. concinna</i> Philippi, 1845 <i>F. hondurasensis</i> Reeve, 1849	Peruana
<i>F. nigra</i> Lesson, 1831	<i>F. violacea</i> Rathke, 1833 <i>F. grandis</i> Sowerby, 1835	Magallánica
<i>F. oriens</i> Sowerby, 1835 Subespecie: <i>F. oriens oriens</i>	<i>F. alba</i> Philippi, 1845 <i>F. australis</i> Philippi, 1845 <i>F. flavida</i> Philippi, 1857 <i>F. hedeia</i> Rochebrune and Mabilie, 1885 <i>F. arenicola</i> Rochebrune and Mabilie, 1885 <i>F. doellojuradoi</i> Pérez-Farfante, 1952 <i>F. cheullina</i> Ramirez-Boehme, 1974 <i>F. oblonga</i> Ramirez-Boehme, 1974 <i>F. mexicana</i> , Sowerby, 1835	Magallánica
Subespecie: <i>F. oriens fulvescens</i>	<i>F. fulvescens</i> Sowerby, 1835	
<i>F. peruviana</i> Lamarck, 1822	<i>F. subrotunda</i> Deshayes, 1830 <i>F. affinis</i> Sowerby, 1835 <i>F. clypeus</i> Sowerby, 1835 <i>F. occidentis</i> Gould, 1846 <i>F. papudana</i> Ramirez-Boehme, 1974	Peruana
<i>F. pulchra</i> Sowerby, 1835		Peruana

<i>F. picta</i> (Gmelin, 1791)		Magallánica
Subespecie: <i>F. picta lata</i>	<i>F. lata</i> Sowerby , 1835	
	<i>F. navidensis</i> Ramirez-Boehme, 1974	
Subespecie: <i>F. picta picta</i>	<i>F. atrata</i> Reeve, 1850	
	<i>F. muricata</i> Reeve, 1850	
<i>F. radiosa</i> Lesson, 1831	<i>F. grisea</i> Reeve, 1849	Magallánica
Subespecie: <i>F. radiosa radiosa</i>	<i>F. nigra</i> Philippi, 1845, not Lesson, 1831	
	<i>F. darwinii</i> Reeve, 1849	
	<i>F. exquisita</i> Reeve, 1850	
	<i>F. philippiana</i> Reeve, 1850	
	<i>F. philippii</i> Hupé, 1854	
	<i>F. polygona</i> Sowerby II, 1862	
	<i>F. dozei</i> Rochebrune and Mabilie, 1885	
Subespecie: <i>F. radiosa tixierae</i>	<i>F. tixierae</i> Métivier, 1969	

Lo anterior ha quedado reflejado desde los estudios iniciales realizados en Chile sobre la taxonomía de *Fisurella*, por diferentes autores. Así, desde que J. F. Gmelin (1791) denominara como *Fissurella picta* a lapas de Magallanes, se han sucedido numerosos nombres para las especies. Una detallada revisión histórica se encuentra en McLean (1984).

Una nueva propuesta de clasificación fue realizada por McLean (1984). En esta se reducen a 13 el número de especies, de un total de 58 nombres específicos existentes, y a tres se les considera como subespecies, incorporando todas las denominaciones sinónimas para cada una de ellas, y destacando las provincias biogeográficas a las que pertenecen (Tabla 8).

Entre los caracteres de valor sistemático considera fundamentalmente los referidos a la concha, el color y textura lateral del pie, con los cuales estructuró un listado de caracteres claves para identificar cada especie los que se muestran en la Tabla 9 y Tabla 10.

La clasificación propuesta por McLean (1984) ha sido ampliamente aceptada utilizándose de referencia para diferentes estudios, desde los estrictamente biológicos hasta aquellos relacionados con la pesquería de *Fissurella*. Además, ha servido para sustentar la elaboración de claves para la determinación de las especies que habitan en el Pacífico Sudoriental.

Tabla 9. Lista de caracteres clave (McLean, 1984).

	Talla mm	Altura	Escultura	Contorno de la base
<i>F. peruviana</i> (1)	Pequeña 25-40	Baja a alta	Costillas medianas, primarias prominentes	Ovalado a alargado
<i>F. maxima</i> (2)	Grande 80-135	Media	Costillas medianas, primarias prominentes	Ovalado a alargado
<i>F. latimarginata</i> (3)	Grande 70-115	Baja a media	Costillas finas	Filudo ovalado
<i>F. cumingi</i> (4)	Grande 80-100	Media	Costillas medianas	Filudo ovalado
<i>F. costata</i> (5)	Mediana 50-80	Baja a media	Costillas prominentes	Ovalado
<i>F. picta picta</i> (6)	Grande 65-95	Media	Costillas prominentes	Ovalado a alargado
<i>F. picta lata</i> (7)	Mediana 50-80	Media a alta	Costillas prominentes	Ovalado
<i>F. rad. radiosa</i> (8)	Pequeña 40-55	Baja a media	Costillas medianas, primarias prominentes	Filudo alargado
<i>F. rad. tixierae</i> (9)	Pequeña 24-45	Media	Costillas medianas, primarias prominentes	Filudo alargado
<i>F. oriens oriens</i> (10)	Mediana 40-70	Baja a media	Costillas finas, amplias	Ovalado a alargado
<i>F. o. fulvescens</i> (11)	Mediana 45	Baja	Costillas finas, amplias	Ovalado a alargado
<i>F. nigra</i> (12)	Grande 70-110	Media	Costillas finas, débiles	Ovalado a alargado
<i>F. limbata</i> (13)	Grande 60-90	Media	Ondulaciones	Ovalado a alargado
<i>F. crassa</i> (14)	Mediana 60-90	Baja	Ondulaciones	Ovalado a alargado
<i>F. bridgesii</i> (15)	Grande 65-90	Baja	Estrías irregulares	Filudo ovalado
<i>F. pulchra</i> (16)	Mediana 35-75	baja	Ondulaciones	Filudo ovalado

Dos claves (Anexo 1 y 2) elaboradas por Oliva & Castilla (1992) utilizando tanto conchas vacías provenientes de conchales como ejemplares vivos completos, permiten la identificación de 10 especies de *Fissurella* frecuentes en los conchales indígenas y en la pesquería de Chile Central y Sur comprendida entre Los Vilos (31° 55' S, 71° 31' W) y la desembocadura del río Bío Bío (36° 49' S, 73° 08' W).

**Tabla 10. Lista de caracteres clave. Continuación (McLean, 1984).**

Color de la concha	Margen de la concha	Orificio apical	Color lateral del pie
(1) Rojo, gris o con rayos blancos	Angosto, con rayos	Ovalado	Gris-marrón moteado
(2) Rayos marrón rojizo sobre blanco	Amplio, rayos en el borde externo	Ovalado	Marrón oscuro moteado
(3) Gris púrpura	Amplio, marrón rojizo	Alargado ovalado	Negro con el borde externo del manto amarillo
(4) Rayos rojizos sobre amarillo oscuro	Amplio, con rayos en todo el ancho	Alargado ovalado	Marrón rojizo moteado
(5) Rayos grises sobre amarillo	Amplio, con rayos en todo el ancho	Alargado ovalado, pequeño	Gris rosáceo moteado
(6) Rayos grises partidos sobre zona clara	Amplio, con rayos intensos en el borde exterior	Alargado	Marrón claro-negro moteado
(7) Rayos grises partidos sobre zona clara	Amplio, con rayos intensos en el borde exterior	Alargado	Marrón-negro moteado
(8) Rayos grises o rojizos sobre blanco	Estrecho, con rayos	Alargado	Gris-marrón moteado
(9) Rayos grises o rojizos sobre blanco	Estrecho, con rayos	Alargado	Gris-marrón moteado
(10) Rayos rojos a grises sobre zona clara	Ancho mediano con rayos	Alargado ovalado	Marrón rosáceo moteado
(11) Rayos rojizos sobre zona amarillo oscura	Ancho mediano con rayos	Alargado ovalado	No visto
(12) Gris, rayos tenues	Amplio, gris, oscuro en el borde	Alargado ovalado biselado	Gris moteado
(13) Rayos púrpura sobre amarillo oscuro	Amplio, púrpura, blanco en el borde	Alargado	Gris claro moteado
(14) Marrón, rayos tenues	Marrón	Muy largo, estrecho	Manto con bandas marrones, pie gris moteado
(15) Gris marrón, rayos tenues	Amplio, marrón rojizo	Alargado ovalado	Marrón-negro moteado
(16) Rayos y manchas sobre marrón rosáceo	Amplio, marrón rojizo	Alargado	Rosáceo claro moteado

Otra clave (Anexo 3), para la identificación de gasterópodos en la zona intermareal rocosa del centro-sur de Chile, incorpora la identificación de 10 especies de *Fissurella*, 8 de las cuales están contenidas en las claves anteriores

(Aldea & Valdovinos, 2005). Aunque en las claves las descripciones de los caracteres aparecen asociados para una determinada especie, ellos no dejan de tener un fuerte componente valorativo que no queda al margen de la subjetividad al momento de aplicarlos a individuos que poseen caracteres complejos y difíciles de definir.

### III.2. Grupos de especies

Dentro del subgénero *Fissurella* “sensu stricto” se distinguen tres grupos de especies, en base a la presencia o ausencia de la escultura del complejo radial y al grosor relativo de las capas de aragonita y calcita (McLean, 1984).

- a. Grupo *F. peruviana*: especies de pequeño tamaño en las que el espesor de la capa interna aragonítica es similar a la externa calcítica. Las costillas radiales primarias y secundarias son notorias en todos los estados de crecimiento. Además de *F. peruviana* Lamarck, 1822, este grupo incluye a *F. nimbose* (Linnaeus, 1757), de la fauna tropical del Caribe y a *F. volcano* Reeve, 1849, del agua cálido-templada de la fauna californiana.

Se postula que estas especies representan la unión entre las especies tropicales del subgénero *Cremides* y las especies sudamericanas del subgénero *Fissurella*.

- b. Grupo de *F. maxima*: son especies de concha grande que tienen una capa externa que supera en grosor a la interna. La escultura radial se caracteriza porque las costillas primarias son más prominentes que las secundarias. Este grupo comprende 8 especies: *F. maxima* Sowerby, 1835; *F. latimarginata* Sowerby, 1835; *F. cumingi* Reeve, 1849;

*F. costata* Lesson, 1831; *F. picta* (Gmelin, 1791); *F. radiosa* Lesson, 1831; *F. oriens* Sowerby, 1835 y *F. nigra* Lesson, 1831. De este grupo *F. nigra*, *F. oriens*, *F. picta* y *F. radiosa* son las únicas especies que pertenecen a la provincia Magallánica y las restantes a la Peruana.

- c. Grupo de *F. limbata*: las especies tienen una concha relativamente grande y el grosor de la capa externa excede al de la interna. Carece de costillas secundarias. Las primarias pueden ser bajas y amplias con aspecto de muy bajas ondulaciones o estar ausentes. Las especies de este grupo son *F. limbata* Sowerby, 1835; *F. crassa* Lamarck, 1822; *F. bridgesii* Reeve, 1849 y *F. pulchra* Sowerby, 1835. Todas estas especies corresponden a la Provincia Peruana.

Cabe destacar que la identificación y denominación actual de las especies de *Fissurella*, no ha sido contrastada con ningún estudio complementario que permita dar nuevas evidencias para sustentar la validez del estado taxonómico de las especies descritas. No obstante, en recientes análisis de la ultraestructura de espermatozoides de las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi* y *F. crassa* se mencionan diferencias en el tamaño y forma del núcleo, en el número de mitocondrias (5 o 6 en la pieza media), y componentes del acrosoma (en particular la zona subacrosómica con contenido variable de densidad electrónica), a los cuales se les menciona como caracteres de valor taxonómico (Collado & Brown, 2003; 2005). Estas diferencias al nivel de ultramicroscopía son mínimas y podrían representar variabilidades intraespecíficas en vez de interespecíficas, al igual que los caracteres macroscópicos de la concha los cuales, como se ha reseñado, tienen un gran componente de subjetividad.



### III.3. Antecedentes biológicos de *Fissurella*

#### III.3.A. Taxonomía

A los organismos pertenecientes al género *Fissurella* que habitan en el Pacífico Sudoriental, se les ha asignado la siguiente posición taxonómica:

Reino: Animalia Linnaeus, 1758

Subreino: Bilateria (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983

Superfilo: Eutrochozoa

Filo: Mollusca Cuvier, 1795

Subfilo: Adenopoda Salvini-Plawen, 1971

Superclase: Conchifera Gegenbaur, 1878

Clase: Gastropoda Cuvier, 1797

Subclase: Orthogastropoda Ponder & Lindberg, 1996

Orden: Archaeogastropoda, Thiele, 1925

Suborden: Vetigastropoda Salvini-Plawen, 1980

Superfamilia: Fissurelloidea Fleming, 1822

Familia: Fissurellidae Fleming, 1822

Subfamilia: Fissurellinae Fleming, 1822

Género: *Fissurella* Brugière, 1789

Subgénero: *Fissurella* Brugière, 1789

Grupo de *F. peruviana*

Especie: *Fissurella peruviana* Lamarck, 1822

Grupo de *F. maxima*

Especie: *Fissurella maxima* Sowerby, 1835

*Fissurella latimarginata* Sowerby, 1835

*Fissurella cumingi* Reeve, 1835

*Fissurella costata* Lesson, 1831

*Fissurella nigra* Lesson, 1831

*Fissurella picta* (Gmelin, 1791)

*Fissurella radiosa* Lesson 1835

*Fissurella oriens* Sowerby, 1835

Grupo de *F. limbata*

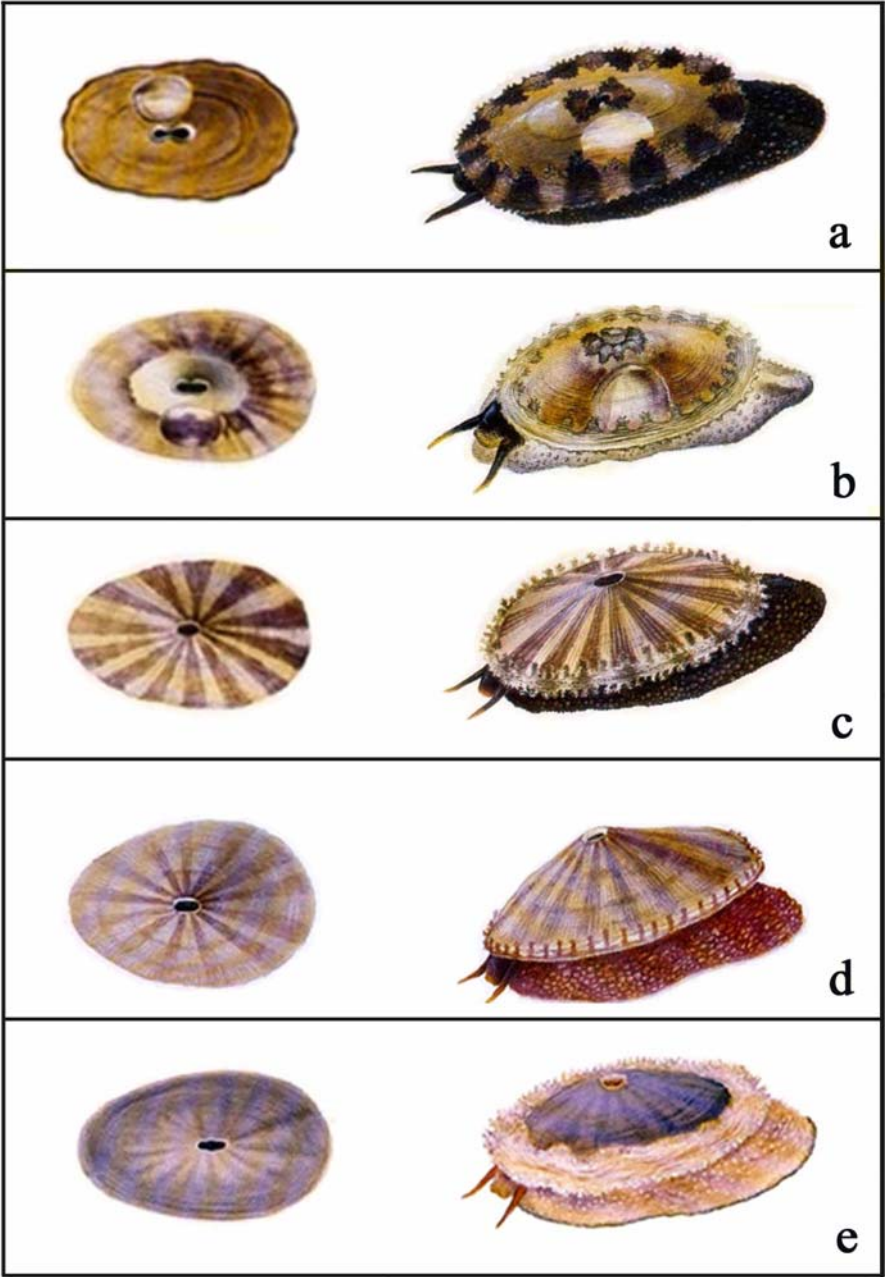
Especie: *Fissurella limbata* Sowerby, 1835

*Fissurella crassa* Lamarck, 1822

*Fissurella bridgesii* Reeve, 1849

*Fissurella pulchra* Sowerby, 1835

Aspectos de la morfología corporal y de la concha de algunas especies de *Fissurella* se muestran en la Figura 5.



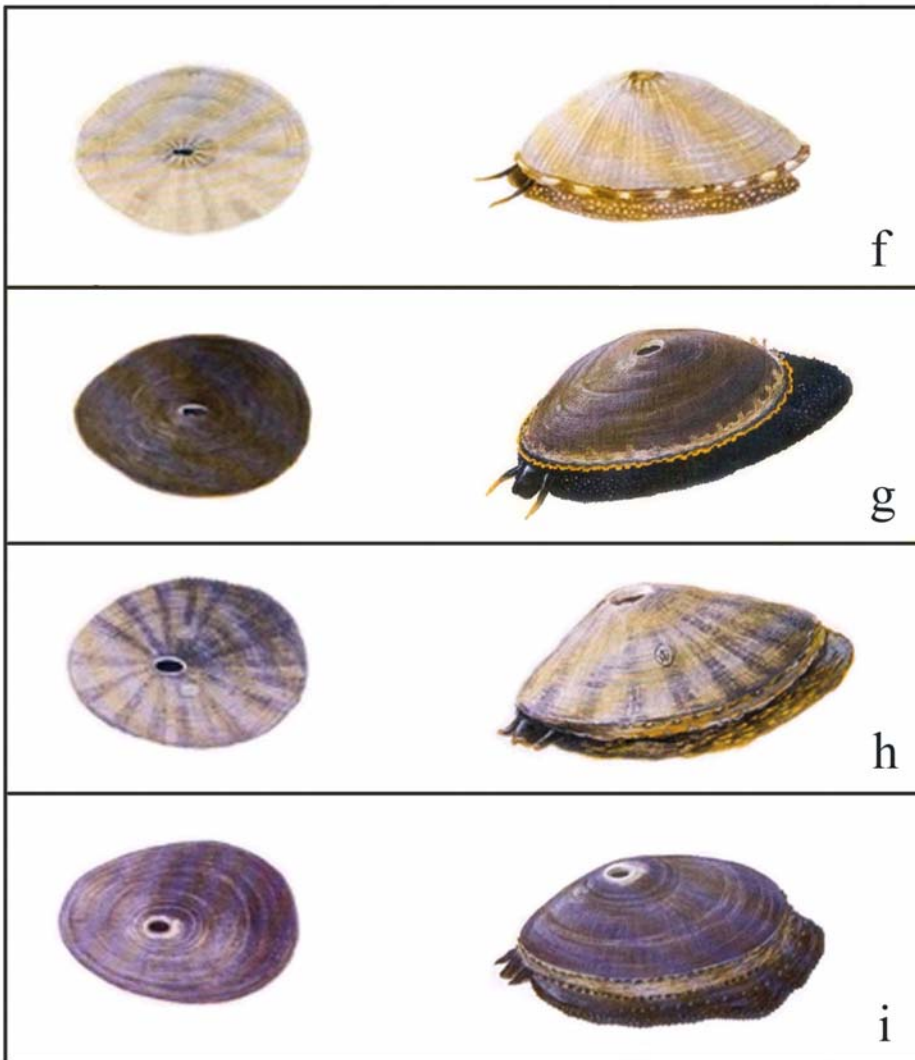


Figura 5. Imágenes de especies representativas del género *Fissurella*: a: *F. crassa*, b: *F. limbata*, c: *F. maxima*, d: *F. cumingi*, e: *F. pulchra*, f: *F. costata*, g: *F. latimarginata*, h: *F. picta*, i: *F. nigra*.

### III.3.B. Distribución

Las especies consideradas se distribuyen exclusivamente en la zona del Pacífico Sudoriental desde la provincia biogeográfica Peruviana a la provincia Magallánica, conviviendo en simpatria en la zona bentónica del litoral rocoso. McLean (1984) menciona la distribución latitudinal para cada especie, destacando que 4 especies son exclusivas de la provincia Magallánica y que existiría una zona intermedia en la que coexisten las 13 especies. El rango de distribución para cada una de ellas se muestra esquemáticamente en la Figura 6 y es el siguiente:

*F. bridgesii*: esta especie se distribuye entre Isla Guanape, Perú (8° 32' S) hasta el río Bío Bío, Concepción, Chile (36° 48' S).

*F. costata*: la distribución de la especie está dentro de los límites de Chile, comprendidos desde Punta Pichalo, Tarapacá (19° 36' S) hasta Guabun, Isla de Chiloé (41° 50' S). Oliva y Castilla (1992), extienden la distribución un poco más al sur, hasta la localidad de Ahuenco, en la Isla de Chiloé (42° 06' S).

*F. crassa*: se localiza desde Haurmey, Perú (10° 06' S) hasta Punta Pulga, Isla de Chiloé, Chile (42° 06' S).

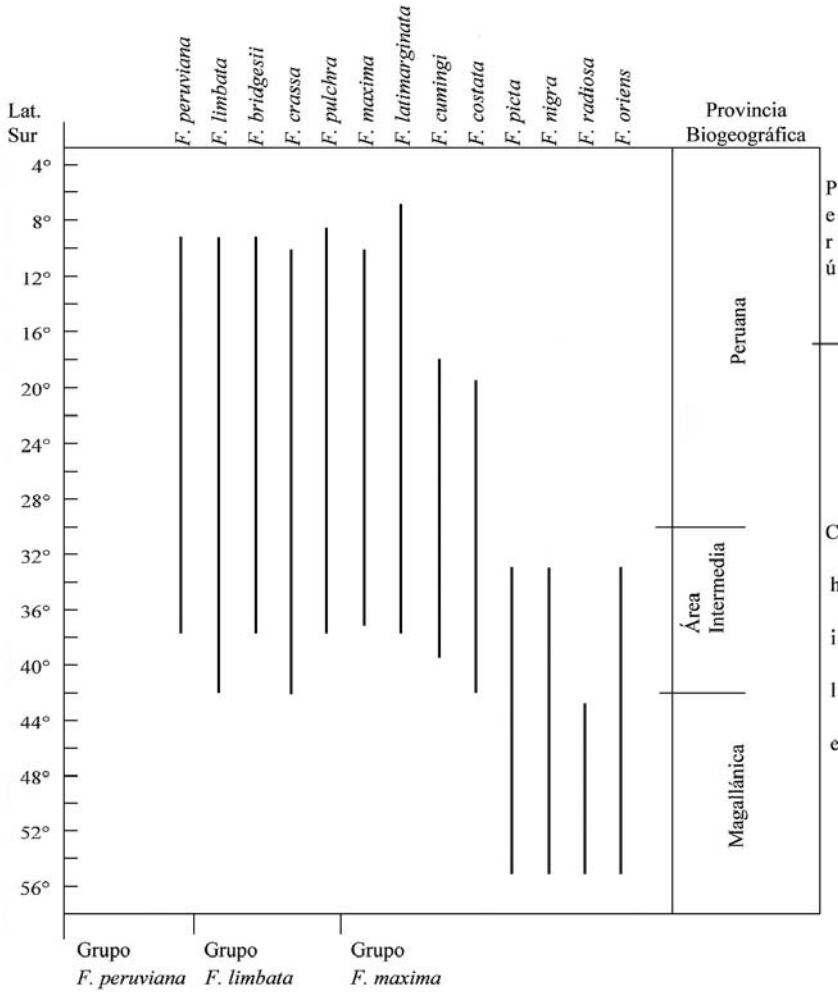
*F. maxima*: su distribución es tan extensa como la mayoría de las otras especies de la Provincia Peruviana. Generalmente se distribuye desde Huarney, Perú (10° 06' S) hasta la localidad de Lirquén, Chile (36° 41' S).

*F. latimarginata*: se encuentra distribuída desde Chiclayo, Perú (6° 47' S) hasta la zona del río Bío Bío, Chile (36° 48' S).

*F. limbata*: la distribución de esta especie comprende desde la Isla Guanape, Perú (8° 30' S) hasta aproximadamente la Isla de Chiloé, Chile (41° 50' S).

*F. pulchra*: se halla desde Salaberry, Perú (8° 14' S) hasta la desembocadura del río Bío Bío, Chile (36° 48' S).

*F. peruviana*: se distribuye desde Chiclayo, Perú ( $6^{\circ} 47' S$ ) hasta el noreste de la Isla de Chiloé ( $41^{\circ} 50' S$ ). Sin embargo, McLean restringe el rango a un espacio menor comprendido entre Isla Guanape, Perú ( $8^{\circ} 32' S$ ) y el río Bío Bío, Chile ( $36^{\circ} 48' S$ ).



**Figura 6.** Esquema de la distribución de las especies de *Fissurella* en la región del Pacífico Sudoriental.

*F. cumingi*: el rango de distribución de esta especie está comprendido entre Matamari, Perú (17° S) y Mehuin, Valdivia, Chile (39° 23' S).

*F. picta*: especie que en el Pacífico se distribuye entre el Islote Concón, Valparaíso, Chile (32° 52' S) hasta Tierra del Fuego y se continúa por el Atlántico hasta la Isla de los Estados, Argentina (55° S). La subespecie *F. picta picta* se encuentra entre la Isla de Chiloé (41° 50' S) y la región de Magallanes (56° S), Chile.

*F. radiosa*: se halla distribuida desde el Golfo Corcobado, al este de la Isla de Chiloé (42° 42' S, 72° 52' W) a Tierra del Fuego (55° S) y por el Atlántico en dirección al norte de Argentina hasta Golfo de San Matías (42° S). La subespecie *F. radiosa tixierae* es característica de la Provincia Magallánica Argentina (42° S).

*F. oriens*: se encuentran desde el Islote Concón, Chile (32° 52' S) hasta Tierra del Fuego. La subespecie *F. oriens fulvescens* desde la proximidad de Valparaíso hasta Concepción y *F. oriens oriens* desde Mehuin al Sur de Chile.

*F. nigra*: especie con distribución comprendida entre Valparaíso, Chile (33° 02' S) y Puerto Grandi al sur de la Isla Navarino (55° 12' S), pero frecuentemente se encuentra entre Concepción, Mehuin y Chiloé.

### III.3.C. Hábitat

Es conocido que las especies que ocupan áreas territoriales comunes se distribuyen el hábitat para evitar la competencia entre ellas. Los estudios realizados en *Fissurella* han permitido determinar que las características generales del hábitat para cada una de las especies son las siguientes:

*F. bridgesii*: habita frecuentemente en la zona intermareal inferior y sublitoral superior hasta 2 m de profundidad. Se encuentra en sustrato rocoso próximo a playas de arena. Sobre las rocas también habitan otras especies como *Stichaster striatus* Muller y Troschell, 1840; *Balanus laevis* Bruguière, 1789 y

*Chthamalus scabrosus* Darwin, 1854. En primavera también se encuentra *Concholepas concholepas* Bruguière, 1789 (Bretos, 1979).

*F. costata*: se encuentra ocupando las superficies verticales de las rocas expuestas al oleaje durante la marea baja, cerca de la línea ocupada por el alga café *Lessonia*. En algunas localidades *F. costata* comparte el área rocosa con otras especies de *Fissurella* (McLean, 1984).

*F. crassa*: vive en toda la extensión del área intermareal rocosa comprendida entre *Chthamalus* y el cinturón de *Lessonia*. En Chile Central cohabita con *F. limbata* (Bretos, 1978; 1980a; 1980b) y en el norte de Chile (23° 30'S - 23° 50'S) coexiste con *F. limbata*, *F. cumingi* y *F. maxima* habitando en *Pyura praeputialis*, ascidia que coloniza el intermareal rocoso y pozas submareales (Castilla *et al.* 2004).

*F. cumingi*: habita sobre la superficie de las rocas de la zona intermareal baja y la submareal adyacente hasta profundidades de 15 m. Es frecuente que se encuentre compartiendo un espacio común con *F. latimarginata* (McLean, 1984). También, habita en *Pyura praeputialis*, ascidia que coloniza las rocas del intermareal medio (Castilla *et al.* 2004)

*F. limbata*: se halla en la zona comprendida entre el intermareal medio e intermareal bajo, en área cubierta con algas pardas y expuesta al suave oleaje (McLean, 1984). En esta misma zona utiliza el hábitat que ofrece *Pyura praeputialis* (Castilla *et al.* 2004).

*F. maxima*: habita en áreas rocosas que quedan expuestas parcialmente durante la marea baja. Vive en la zona comprendida entre el intermareal inferior y la submareal alta, bajo las frondas y en los alrededores del alga parda *Lessonia* sp. (Bretos, 1982; Bretos *et al.* 1983; McLean, 1984). Castilla *et al.* (2004), mencionan que en el intermareal y submareal también habita sobre la ascidia *Pyura praeputialis*.

*F. nigra*: comúnmente habita en la zona intermareal, sobre la superficie lateral de las rocas ubicadas entre la franja intermareal media y la intermareal baja. También, en la franja intermareal habita en zonas debajo de cantos rodados y en las grietas que quedan entre ellos (McLean, 1984; Oliva & Castilla, 1992).

*F. oriens*: se localiza principalmente en la zona sublitoral, extendiéndose hasta el intermareal bajo. En algunos sitios a profundidades de 10 m sobre rocas cercanas a la interfase roca – arena (McLean, 1984).

*F. pulchra*: Bretos & Chihuailaf (1990) observaron que habita en la zona intermareal inferior y el sublitoral superior, de preferencia entre 1 a 4 m (aunque en ocasiones ha sido extraída desde 20 m) de profundidad, sobre rocas, en grietas u oquedades de las rocas, compartiendo su hábitat con las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi* y en ocasiones con *F. maxima* y *F. costata*. También, comparten el hábitat con los invertebrados *Balanus laevi* Bruguieri, 1789, *Chthamalus scabrosus* Darwin, 1854, *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) y *Concholepas concholepas*. Los juveniles se encuentran en la zona intermareal inferior o en pozas bajas cercanas al cinturón inferior de macroalgas con abundantes algas coralinas incrustantes.

*F. peruviana*: preferentemente habita en la zona submareal y ocasionalmente en la intermareal baja, sobre las rocas. En algunas áreas (norte de Chile) vive a 20 m, en los sustratos rocosos ocupados por el bivalvo *Aulacomia ater* (McLean, 1984; Guzmán *et al.* 1998)

*F. picta*: habita las plataformas rocosas de la zona intermareal media a inferior, sobre las superficies horizontales y verticales. Comparte el hábitat con *F. costata* y *F. crassa* y con otros invertebrados como: *Balanus laevis* Bruguieri, 1789, *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819), *Phymactis clematis* Drayton, 1846, *Chiton granosus* Fremby, 1827, *Piura Chilensis* Molina, 1784, *Tegula atra* (Lesson, 1830), y *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) y



con las algas *Ulva lactuca* (L., 1752), *Porphyra columbina* (Montagne, 1845), *Iridaea laminarioides* Bory, 1826 y *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820 (Bretos *et al.* 1988a; Oliva & Castilla, 1992).

*F. latimarginata*: los individuos juveniles (10-30mm) se localizan en la zona intermareal inferior, en pozas de nivel bajo, o en grietas de las rocas cubiertas por cirripedios del género *Chthamalus*. Los adultos habitan en la zona submareal rocosa, desde el margen situado por debajo de las frondas del alga parda *Lessonia trabeculata* hasta profundidades de 10 m, aunque ocasionalmente se les ha capturado a 15 m de profundidad. *F. latimarginata* suele compartir el hábitat con *F. cumingi* y es frecuente encontrar mezcladas a las dos especies. También, se puede encontrar en el mismo hábitat a *F. pulchra*. El sustrato donde habita está cubierto generalmente por algas coralinas e incrustantes *lithothamniodes*. También están presentes las algas *Gelidium chilense*, *Callophyllis* sp., *Colpomenia* sp., *Ulva lactuca* y *Macrocystis integrifolia*. Otros invertebrados que comparten el hábitat son: *Balanus laevis* Bruguieri, 1789, *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789), *Tetrapygus niger* (Molina, 1782), *Tegula atra* (Lesson, 1830), *Stichaster striatus* Muller y Troschell, 1840 y *Heliaster helianthus* (Lamarck, 1816), el cual es predador de las lapas (Olivares *et al.* 1998).

*F. radiosa*: ocupa la zona intermareal más profunda y en pozas hasta los 20 m de profundidad (McLean, 1984).

### **III.3.D. Alimentación**

Los grandes gasterópodos, herbívoros generalistas, alteran la abundancia y composición en especies de algas modificando la estructura de las comunidades intermareales. El conocimiento de los hábitos alimenticios es esencial para comprender la posición trófica de la especie y sus interacciones con otros organismos del área en que habita (Moreno & Jaramillo, 1983; Jara &

Moreno, 1984; Santelices *et al.* 1986; Oliva & Castilla, 1986). También, la posición en el nivel trófico y distribución batimétrica son útiles para comprender los procesos que desencadenan la especialización y diferenciación de las especies. Sin embargo, la información sobre este aspecto de la biología de *Fissurella* de Chile está referida solamente a las dos siguientes especies.

*F. crassa*: en una población de *F. crassa* del norte de Chile, se observó que los animales presentaban un desplazamiento circadiano coincidente con las mareas. En las horas diurnas de marea baja permanecieron en sus refugios y en la noche, durante la marea alta, se desplazaban a comer consumiendo preferentemente *Ulva* sp. y *Enteromorpha* sp. También, se movilizaron estacionalmente, en busca de alimentos ya que las algas muestran variaciones estacionales, migrando desde la zona intermareal de *Colpomenia* y *Lessonia*, en la que permanecieron en invierno, a la zona submareal alta de *Lessonia* en el verano, compitiendo en esta zona con otras especies de *Fissurella* y otros herbívoros como chitones y erizos (Bretos, 1978).

En coincidencia con las variaciones estacionales del alimento, *F. crassa* presenta perturbación estacional de su crecimiento, caracterizado por una disminución de éste en invierno e inicio de primavera y otro en verano-otoño. Este patrón queda evidenciado mediante la formación de dos anillos de crecimiento en la concha, pero no hay evidencias para asociar el patrón de crecimiento de esta especie con las variaciones de la fuente alimenticia, u otros factores como el sexo, edad y reproducción (Bretos, 1980a; 1980b).

En otra población de *F. crassa* situada en Chile central (33° 35' S, 71° 38' W), la dieta estuvo compuesta por una gran variedad de microalgas y macroalgas (*Schotera*, *Gelidium*, ulvóides y algas calcáreas); y además, restos de invertebrados y esporas (Santelices *et al.* 1986).

*F. maxima*: es una especie generalista con una alimentación variable a lo largo del año y que está basada en 13 especies de algas. La dieta de

*F. maxima* está formada por las macroalgas *Chondrus canaliculatus*, *Glossophora kunthii*, *Halopteris funicularis*, *Corallina officinalis* var. *chilensis*, *Lessonia nigrescens*, *Codium dimorphum* Svedelius, *Adenocystis utricularis*, *Porphyra columbina*, *Pterosiphonia dendroidea*, *Gelidium* sp., *Ulva* sp., *Cladophora* sp. y *Enteromorpha* sp. También *F. maxima* ingiere diatomeas de los géneros *Synedra*, *Lichmophora*, *Thalassiosira*, *Cocconeis*, *Pleurosigma* y *Coscinodiscus* y animales pequeños (crustáceos, gasterópodos, bivalvos). Las diatomeas y los animales no son digeridos y probablemente son ingeridos pasivamente con las macroalgas (Osorio *et al.* 1988).

Paralelamente a las fluctuaciones estacionales del alimento en *F. maxima*, se ha observado que el crecimiento se retarda o detiene en invierno y en verano, reflejándose en la concha mediante la formación de dos anillos de crecimiento anual, los cuales permiten estimar la edad y crecimiento del animal (Bretos, 1982).

### III.3.E. Epibiontes

La escultura de la concha de *Fissurella* ofrece una superficie adecuada para que una gran diversidad de organismos pueda adherirse y fijarse a ella. Los organismos epibiontes son indicadores adecuados para el conocimiento del medio particular en el cual habita una especie.

*F. bridgesii*: el epibionte más frecuente sobre la concha de esta especie es *Balanus laevis* Bruguière, 1789. Otros epibiontes detectados son *Scurria parasitica* (Orbigny, 1841), *Chthamalus cirrathus* Darwin, 1854, *Chthamalus scabrosus* Darwin, 1854, *Balanus psittacus* (Molina, 1782), *Semimytilus algosus* (Gould, 1850) y las algas *Lithophyllus* sp. y *Gelidium* sp. (Bretos, 1979).

*F. latimarginata*: las finas estrías radiales y los anillos concéntricos de la superficie de la concha son un sustrato óptimo para la fijación de diferentes especies de algas Rhodophyta (*Gelidium* sp., *Callophyllis* sp., *Polysiphonia* sp.,

*Chondria* sp., *Corallina* sp., *Acrosorium* sp., *Asparagopsys* sp. y *Gigartina* sp.), Chlorophyta (*Chaetomorpha* sp., *Cladophora* sp., *Ulva* sp., *Cladocera* sp. y *Enteromorpha* sp.) y Phaeophyta (*Halopteris* sp.). En la concha habitan los invertebrados *Balanus laevis* Bruguière, 1789, los poliquetos perforadores del género *Dodecaeria* y *Polydora*, *Scurria parasitica*, crustáceos *Tanaidaceo* y pequeños individuos de *Fissurella* sp. y *Semimytilus algosus* (Olivares *et al.* 1998).

*F. picta*: sobre la concha se fijan numerosos epibiontes entre los cuales destacan *Balanus laevis* Bruguière, 1789, *Chthamalus scabrosus* Darwin, 1854 y poliquetos. También se encuentran las algas *Ulva lactuca* (L., 1752) y *Lithothamnoides* sp., y pequeños mitílidos (Bretos *et al.* 1988a).

*F. pulchra*: la concha tiene anillos de crecimiento que otorgan un sustrato adecuado para la fijación de epibiontes, fundamentalmente para las algas calcáreas *Lythophyllum* y *Gelidium*. Entre los invertebrados se encuentran los crustáceos cirripedios *Balanus laevis* Bruguière, 1789 y poliquetos cirratúlidos del género *Dodecaeria* (Bretos & Chihuailaf, 1990).

*F. nigra*: normalmente no presenta epibiontes, pero pueden tener cirripedeos, briozoos y poliquetos (McLean, 1984).

### III.3.F. Sexo

En general las especies de *Fissurella* son organismos dioicos, pero en la especie del Mediterráneo *F. nubecula* se observó un 17% de reversión sexual tipo protándrica (Bacci, 1947). En cambio en *F. barbadensis* especie del Caribe no se detectó hermafroditismo (Ward, 1966).

La gónada es única y está localizada en el extremo posterior de la cavidad visceral, adyacente a la glándula digestiva. El ovario y testículo tienen forma sacular y poseen un amplio lumen.

En las observaciones realizadas en las gónadas de diferentes especies de fisurélidos de Chile, se ha detectado que la proporción sexual es 1:1 a

cualquier tamaño del animal, lo cual permite aseverar que las especies son de sexo separado y que en ellas no ocurre la reversión sexual durante el crecimiento ni en la maduración. El ovario es de color verde y el testículo varía en tonalidades de blanco, según el estado de funcionamiento gonadal (Bretos, 1979; Bretos *et al.* 1983; 1988a; Olivares *et al.* 1998; Bretos & Chihuailaf, 1990; 1993.)

### **III.3.G. Parasitismo gonadal**

La fauna parasitaria suele ser usada como un indicador del medio en el cual habitan los organismos. Los moluscos son huéspedes intermediarios para trematodos y los estados larvales de éstos se encuentran en numerosas especies de gasterópodos. Sin embargo, se detectaron trematodos adultos del género *Proctoeces* Odhner, 1911 en la gónada de la mayoría de las especies de *Fissurella* que habitan el litoral rocoso de Chile (*F. bridgesii* Reeve, 1849, *F. costata* Lesson, 1830, *F. crassa* Lamarck, 1822, *F. cumingi* Reeve, 1849, *F. latimarginata* Sowerby, 1835, *F. limbata* Sowerby, 1835, *F. maxima* Sowerby, 1835 y *F. pulchra* Sowerby, 1835). Aunque este parásito gonadal no afecta la salud humana, se debe destacar que solamente el pie de los especímenes de *Fissurella* es consumido, desechándose todas sus vísceras (Bretos & Jiron, 1980).

En los machos y en las hembras de *Fissurella* la intensidad y tasa de infección (prevalencia) gonadal por *Proctoeces lintoni* Siddigi & Cable, 1960, es similar y estarían relacionadas con el tamaño de los animales huéspedes. Los individuos juveniles (pequeños) se infectarían en el momento de acceder a las áreas en las que se encuentran los adultos infectados, siendo los factores microambientales, los que influyen en la variabilidad en cuanto a la prevalencia e intensidad detectada entre las distintas especies (Oliva & Díaz, 1988; 1992).

El parásito *Proctoeces lintoni* (= *P. humboldti*) ocasiona alteraciones en la gónada debido a los efectos combinados de la acción mecánica del acetabulum, a la ingestión de células germinales y a la secreción de sustancias químicas. Las modificaciones estructurales y funcionales del epitelio germinal, disminuyen la capacidad de *Fissurella* para producir gametos y en casos extremos generan esterilidad (Oliva, 1992).

### III.3.H. Reproducción

Una estrategia desarrollada por las especies para impedir la hibridización es el desarrollo de ciclos reproductivos con características particulares de cada especie. Las especies de *Fissurella* carecen de órganos copuladores y por ello la fecundación ocurre en el medio acuático, cuando los organismos maduros liberan sus gametos.

Se ha observado que las especies de *Fissurella* tienen ciclos reproductivos similares, desovando masivamente dos veces al año. Los estudios han estado restringidos a las siguientes especies:

*F. pulchra*: utilizando el índice gónado-somático (IGS), según la relación  $\text{Peso gónada} \times 100 / \text{Peso animal}$ , se constató que esta especie, en el norte de Chile, desova parcialmente en las distintas estaciones del año, pero la población presenta anualmente dos períodos masivos, uno al final de otoño y otro al término del verano (Bretos & Chihuailaf, 1993).

*F. nigra*: en poblaciones del sur de Chile, se observó que desova en invierno y al término de verano. Además se observaron animales maduros durante todo el año (Bretos *et al.* 1988b).

*F. picta*: los animales maduros se encuentran todo el año, pero los porcentajes mensuales son variables. El mayor porcentaje desova en primavera y a fines del verano (Bretos *et al.* 1988a)

*F. maxima*: machos y hembras muestran la misma tendencia del IGS. Un pico del IGS aparece en noviembre y otro en julio, por lo cual se deduce que hay desove masivo en diciembre (final primavera-inicio verano) y en agosto-septiembre (desove de invierno) en asociación con las variaciones estacionales de la temperatura del agua. Sin embargo, también hay animales maduros todo el año, lo cual no permite descartar que una parte de la población se pueda reproducir a lo largo del año (Bretos *et al.* 1983).

### **III.3.I. Morfometría**

Se han definido diversas relaciones entre las distintas dimensiones de la concha y del orificio apical, en referencia al largo de la concha. Entre otras, la relación entre el ancho y largo de la concha (AC vs. LC), entre el alto y largo de la concha (AIC vs. LC), entre el largo del orificio apical y largo de la concha (LOA vs. LC), ancho del orificio apical con largo de la concha (AOA vs. LC).

Estas relaciones cuantitativas podrían ser de utilidad para complementar las imprecisas evaluaciones cualitativas, usadas como caracteres diagnósticos de especie. Sin embargo, aún no se ha demostrado si efectivamente estas relaciones se corresponden con algún particular morfotipo de especie y puedan ser un aporte efectivo y de utilidad para diferenciar las especies entre sí. Algunas de las numerosas relaciones obtenidas para las especies de *Fissurella* se detallan en la Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13.

**Tabla 11. Relaciones entre dimensiones de la concha en especies de *Fissurella*.**

Especie	ACv/s LC	AIC v/s LC	Autor
<i>F. pulchra</i>	AC=0,693LC-1,302	AIC=0,269LC -2,958	Bretos & Chihuailaf (1990)
<i>F. bridgesii</i>	AC=0,606LC+0,941	AIC=0,271LC -2,303	Bretos (1979)
<i>F. maxima</i>	AC=0,662LC+0,462 LT=(AN/0,632) <sup>0,991</sup>	AIC=0,354LC -8,492 LT=(AT-0,007)/0,239	Bretos (1982) Oliva & Castilla (1992)
<i>F. picta</i>	AC=0,748LC-0,966 LT=(AN/0,685) <sup>0,966</sup>	AIC=0,389LC -2,404 LT=(AT/0,252) <sup>0,855</sup>	Bretos et al. (1988a) Oliva & Castilla (1992)
<i>F. latimarginata</i>	AN=0,68LC+0,63 LT=(AN/0,425) <sup>0,794</sup> AC=0,687LC-0,875	AT=0,264LT-6,032 LT=(AT/0,143) <sup>0,771</sup> AIC=0,167LC +1,712	Acuña (1977) Oliva & Castilla (1992) Olivares et al. (1998)
<i>F. limbata</i>	LT=(AN/0,566) <sup>0,903</sup>	LT=(AT/0,254) <sup>0,965</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. costata</i>	LT=(AN/0,693) <sup>0,935</sup>	LT=(AT/0,280) <sup>0,943</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. crassa</i>	LT=(AN/0,529) <sup>0,958</sup>	LT=(AT/0,200) <sup>0,978</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. cumingi</i>	LT=(AN+0,492)/0,761	LT=(AT+0,582)/0,358	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. nigra</i>	LT=(AN/0,622) <sup>0,963</sup>	LT=(AT/0,203) <sup>0,838</sup>	Oliva & Castilla (1992)

**Tabla 12. Relaciones de dimensiones del orificio apical con la concha.**

Especie	LOA v/s LC	AOA v/s LC	Autor
<i>F. pulchra</i>	LOA=0,136LC+1,112	AOA=0,075LC-0,362	Bretos & Chihuailaf (1990)
<i>F. bridgesii</i>	LOA=0,113LC+0,623	AOA=0,055LC+0,606	Bretos (1979)
<i>F. maxima</i>	LOA=0,087LC+0,805 LT=(LO/0,188) <sup>1,493</sup>	AOA=0,078LC-1,619 LT=(AO/0,042) <sup>0,867</sup>	Bretos (1982) Oliva & Castilla (1992)
<i>F. picta</i>	LOA=0,106LC-0,389 LT=(LO/0,135) <sup>1,174</sup>	AOA=0,051LC-0,282 LT=(AO/0,014) <sup>0,588</sup>	Bretos et al. (1988a) Oliva & Castilla (1992)
<i>F. latimarginata</i>	LT=(LO/0,218) <sup>1,522</sup> LOA=0,101LC+1,697	LT=(AO/0,042) <sup>0,916</sup> AOA=0,049LC+0,405	Oliva & Castilla (1992) Olivares et al. (1998)
<i>F. limbata</i>	LT=(LO/0,189) <sup>1,266</sup>	LT=(AO+0,06)/0,063	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. costata</i>	LT=(LO/0,123) <sup>1,269</sup>	LT=(AO/1,352) <sup>1,965</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. crassa</i>	LT=(LO/0,316) <sup>1,403</sup>	LT=(AO/0,106) <sup>1,567</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. cumingi</i>	LT=(LO-0,247)/0,07	LT=(AO/0,049) <sup>0,883</sup>	Oliva & Castilla (1992)
<i>F. nigra</i>	LT=(LO/0,172) <sup>1,087</sup>	LT=(AO/0,061) <sup>0,847</sup>	Oliva & Castilla (1992)



**Tabla 13. Relaciones entre el largo y peso de las partes del cuerpo del animal.**

Especie	PT	PC	PA	PP	Autor
<i>F. pulchra</i>	0,000238LC <sup>2,934</sup>	0,00003057LC <sup>3,168</sup>	0,000242LC <sup>2,834</sup>	0,000294LC <sup>2,648</sup>	1
<i>F. maxima</i>	0,000251LC <sup>2,884</sup> (LT/0,694) <sup>0,740</sup>	0,00011910LC <sup>2,881</sup> (PC/0,056) <sup>0,334</sup>	0,000129LC <sup>2,89</sup> (PSC/0,087) <sup>0,333</sup>	(PP/0,088) <sup>0,353</sup>	1 A 4
<i>F. picta</i>	0,000109LC <sup>3,029</sup> (LT/0,764) <sup>0,734</sup>	0,00002930LC <sup>3,191</sup> (PC/0,081) <sup>0,341</sup>	0,000122LC <sup>2,819</sup> (PSC/0,049) <sup>0,334</sup>	(PP/0,043) <sup>0,348</sup>	2A 4
<i>F. latimar ginata</i>	0,000122LC <sup>3,020</sup> (LT/0,917) <sup>0,762</sup> 0,000101LC <sup>3,038</sup>	0,00004902LC <sup>2,962</sup> (PC/0,018) <sup>0,292</sup> 0,00001262LC <sup>3,346</sup>	0,000127LC <sup>2,89</sup> (PSC/0,087) <sup>0,337</sup> 0,0001985LC <sup>2,278</sup>	0,000097LC <sup>2,824</sup> (PP/0,068) <sup>0,343</sup>	3 4 5
<i>F. limbata</i>	(LT/0,541) <sup>0,711</sup>	(PC/0,054) <sup>0,329</sup>	(PSC/0,123) <sup>0,362</sup>	(PP/0,102) <sup>0,378</sup>	4
<i>F. costata</i>	(LT/0,813) <sup>0,753</sup>	(PC/0,045) <sup>0,305</sup>	(PSC/0,028) <sup>0,304</sup>	(PP/0,015) <sup>0,296</sup>	4
<i>F. crassa</i>	(LT/0,481) <sup>0,698</sup>	(PC/0,046) <sup>0,337</sup>	(PSC/0,177) <sup>0,366</sup>	(PP/0,130) <sup>0,378</sup>	4
<i>F. cumingi</i>	(LT/0,583) <sup>0,713</sup>	(PC+35,62)/7,705	(PSC+35,77)/8,96	(PP/0,065) <sup>0,347</sup>	4
<i>F. nigra</i>	(LT/0,727) <sup>0,725</sup>	(PC/0,028) <sup>0,293</sup>	(PSC/0,067) <sup>0,342</sup>	(PP/0,074) <sup>0,366</sup>	4

Autor: 1: Bretos & Chihuailaf, (1990); 1A: Bretos, M. (1982); 2A: Bretos, *et al* (1988a) ;3: Olivares *et al.* (1998); 4: Oliva & Castilla (1992); 5: Acuña, 1977

## IV. *Fissurella* como recurso

### IV.1. Durante el Holoceno

Desde tiempos prehistóricos la zona costera de Chile ha sido explotada. Los primitivos habitantes formaron pequeñas agrupaciones que se establecieron en aquellos sitios que ofrecían condiciones adecuadas y mínimas para la subsistencia; una de ellas, y quizás la primordial, fue la posibilidad de obtener los alimentos mediante la captura y recolección de los recursos existentes en el litoral marino.

Las evidencias de la actividad marina desarrollada por los grupos indígenas han quedado testimoniadas en los restos de los diferentes asentamientos con numerosos conchales, que nos permiten conocer cómo se

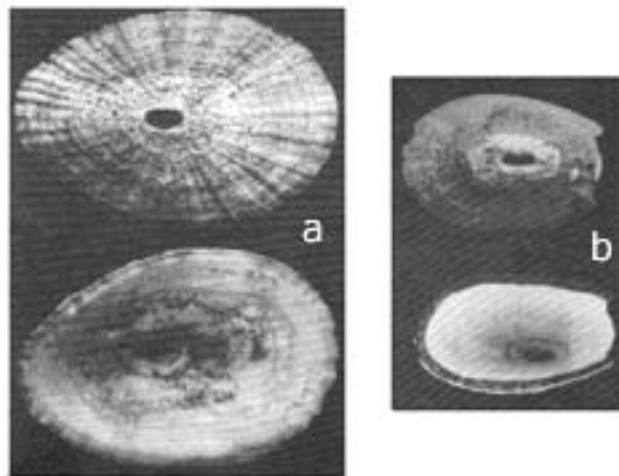
vivía en el pasado y que se han conservado en algunos lugares del litoral (Álvarez, 2004; Báez *et al.* 2004; Standen *et al.* 2004).

Estudios de estos vestigios, realizados por diferentes autores, han permitido establecer una reseña focalizada hacia la utilización de los recursos marinos. Con especial énfasis se resalta la incorporación de los moluscos en general, y en particular los del género *Fissurella*, como uno de los medios de subsistencia.

Los grupos humanos de Chile, desde el Holoceno temprano y hasta el Holoceno tardío, desarrollaron un modo de vida denominado arcaico, sustentado en una economía de recolección, pesca y caza. No obstante, los mariscos fueron los primeros recursos explotados, por encontrarse en abundancia, ser fáciles de recolectar y requerir de técnicas menos especializadas en comparación con la pesca. El período Arcaico ha sido datado entre 11.000 y 3.000 AP y ha sido subdividido en Arcaico temprano, medio y tardío (Llagostera, 1989).

En el norte de Chile, durante el Arcaico temprano (ca. 10.500 - 7.000 AP), las primeras ocupaciones humanas ocurrieron en el sitio de Acha (ca. 18° 30' S, 70° 17' W) alrededor de 9.000 AP, Tiliviche (ca. 9.500 AP) y Aragón (ca. 8.500 AP). Los dos últimos sitios ubicados a 40 km de la costa, hacia el interior (ca. 19° 32' S, 69° 57' W). En el sitio costero de Acha, numerosos restos de fauna ponen de manifiesto la recolección de recursos marinos, básicamente los de la zona intermareal rocosa, tales como los moluscos *Concholepas concholepas*, *Thais chocolata*, *F. crassa*, *F. latimarginata* y *F. maxima*. De las dos últimas especies, en la Figura 7 se muestran conchas encontradas en el sitio Acha 2 (Vilaxa & Corrales, 1993).

En el sector de Camarones (ca. 19° 11' S, 70° 17' W), los bioindicadores muestran una variada explotación de recursos, destacándose entre los marinos aquellos moluscos que habitan sustratos arenosos y rocosos como *C. concholepas* y *Fissurella* sp. (Chacama & Muñoz, 2001; Standen *et al.* 2004).



**Figura 7. Conchas de *Fissurella* proveniente de fogones en campamento Acha – 2 (7.000 a.C.). a: *Fissurella maxima*, b: *Fissurella latimarginata*.**

En la quebrada de Tiliviche a 40 Km de la costa, la estratigrafía, revela un aumento del consumo de mariscos entre  $9.760 \pm 365$  y  $4.995$  AP, destacando entre otros: *Aulacomya ater*, *C. concholepas*, *Crepidula* sp, *Acanthopleura echinata* y en menor proporción *F. crassa*, que aparece 6.900 AP (Nuñez & Hall, 1982).

En el complejo cultural Huentelauquén (Los Vilos, ca.  $31^{\circ} 54' S$ ,  $71^{\circ} 30' W$ ), los restos atestiguan algunas de las más tempranas evidencias de la utilización de los recursos marinos en la costa semiárida de Chile. Los pobladores establecidos en los asentamientos de Punta Purgatorio ( $10.040 \pm 70$  AP) y Punta Ñague ( $10.180 \pm 80$  AP) se dedicaron a la extracción de moluscos de arena y de roca, especialmente *Eurhomalea rufa*, *Mesodesma donacium*, *C. concholepas* y las lapas *Fissurella* sp (Jackson, 1993; Jackson *et al.* 1999; Seguel, 2001; Báez *et al.* 2004). En la misma localidad, el sitio arqueológico Punta Penitente ( $8.600 \pm 70 - 2.160 \pm 100$  AP), reveló que las poblaciones

humanas asentadas en esta área entre el Holoceno temprano y Holoceno tardío fueron recolectoras y que entre otros recursos marinos explotaron los moluscos placóforos pertenecientes a los géneros *Chiton* y *Acanthopleura* y los gasterópodos *Concholepas*, *Tegula*, *Acanthina* y *Fissurella* (Méndez, 2002).

En la zona central de Chile, provincia de Cauquenes ca. 53° 58' S, 72° 21' W, en los asentamientos arcaicos (5.410 AP), los depósitos de los recursos comprometidos en la subsistencia, muestran que sus habitantes tuvieron un acceso estable y continuo a la fauna malacológica del intermareal rocoso y arenoso. Se encontraron restos malacológicos correspondientes al menos a 16 especies y géneros entre los cuales también figura *Fisurella* sp.

Entre los años 975-1390 d.C. las poblaciones que habitaron parte del litoral de la Provincia de Cauquenes, se beneficiaron de diferentes moluscos como *F. maxima* y *Fissurella* sp. y otros recursos submareales que extraían mediante buceo apoyados con embarcaciones y equipamiento tecnológicamente simple (Sánchez & Gaete, 1994).

El poblamiento temprano de la costa de la Araucanía, sur de Chile, entre el Bío Bío (36° 48' S, 73° 08' W) y el canal de Chacao (41° 49' S, 73° 32' W), habría ocurrido entre 10.000 y 7.000 AP período que se mantiene sin documentar ya que los probables sitios de asentamientos actualmente se encuentran sumergidos. Durante el período Arcaico medio, comprendido entre 7.000 y 5.000 AP y el tardío, los habitantes ejercieron una actividad dedicada a la colecta de recursos entre los que se incluye los fisurélidos *F. picta*, *F. crassa* y *F. nigra* (Quiroz & Sánchez, 2004).

El sitio arqueológico Monumento Nacional Conchal Piedra Azul (ca. 41° 30' S, 72° 58' W) fue habitado por grupos humanos con tradición de canoeros cazadores, pescadores y recolectores. La colecta se realizó extrayendo moluscos que habitaban tanto en sustratos blandos como en sustratos duros de la zona intermareal. En el caso específico de los fisurélidos, las especies

*F. bridgesii*, *F. latimarginata*, *F. nigra*, *F. picta* y *F. limbata*, aparecen presentes como recurso utilizado aproximadamente entre 7.000 y 5.000 AP (Gaete *et al.* 2004).

#### **IV.2. En el período actual**

Con posterioridad a la época Arcaica y a lo largo del extenso litoral chileno, se establecieron numerosos sitios de pescadores que, poseedores de mejoradas técnicas de extracción y equipamiento, para la recolección, pesca y navegación; le han permitido ampliar el margen y eficiencia de la explotación de la costa en las dimensiones longitudinal, batitudinal y latitudinal (Llagostera, 1989). Este legado cultural, basado en el establecimiento de grupos pequeños dedicados a la pesquería extractiva, ha persistido hasta nuestros días. Actualmente hay reconocidos 558 asentamientos pesqueros, conocidos como “caletas”, de las cuales el 80% son del tipo rural. Las caletas cobijan aproximadamente a 40.000 pescadores, oficialmente registrados, quienes forman parte de la denominada pesquería artesanal. Los especímenes actualmente explotados y comercializados artesanalmente son peces, ascidias, crustáceos, equinodermos y los moluscos del tipo cefalópodos, bivalvos, poliplacóforos y gasterópodos (SERNAPESCA, 2006).

Los especímenes de *Fissurella*, exceptuando *F. peruviana*, que habitan la costa de Chile son algunos de los de mayor tamaño conocidos dentro del género y por ello son muy apetecidos por el público consumidor. Se ha postulado que las aguas relativamente frías de la zona litoral, debido a la corriente de Humboldt, y la disponibilidad de algas para la alimentación favorecerían los procesos fisiológicos que les permiten alcanzar un gran tamaño (Bretos, 1978; Bretos & Chihuailaf, 1990).

De las 13 especies identificadas por McLean (1984); 10 de ellas (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. pulchra*, *F. bridgesii*, *F. costata*, *F. nigra*, *F. picta*, *F. maxima*, *F. crassa* y *F. limbata*) forman una pesquería multiespecífica,

con la denominación genérica *Fissurella* spp. (Bretos, 1988). Las especies *F. oriens* y *F. radiosa* también son extraídas esporádicamente, pero destinadas al consumo familiar. En tanto que *F. peruviana* no se extrae ni para fines de consumo ni para comercialización debido a su pequeño tamaño que no supera los 31mm.

La carencia de normas administrativas para la regulación de la extracción de lapas y la restricción pesquera establecida sobre otros moluscos, en especial de *C. concholepas*, provocó el desplazamiento del esfuerzo pesquero hacia las especies de *Fissurella*, consideradas como el sustituto adecuado para ocupar el espacio de mercado generado por *C. concholepas*.

En las estadísticas oficiales chilenas del año 1978, se reporta por primera vez un registro de 25 toneladas (anual) de extracción de *Fissurella* y desde entonces se ha señalado un aumento sostenido en los registros anuales de los desembarques pesqueros para este recurso.

Entre los años 1991 y 2003, el desembarque anual osciló de 2.000 a 6.000 toneladas, en el año 2004 alcanzó un máximo de 12.851 toneladas y en el año 2005 desciende a 2.003 toneladas. Estas capturas corresponden a un porcentaje promedio anual de  $69 \pm 38$  %, respecto al total de gasterópodos colectados, en el mismo lapso de tiempo. En la Figura 8 se muestran las fluctuaciones anuales del desembarque y de los porcentajes relativos a gasterópodos, los cuales fueron elaborados a partir de las cifras mencionadas en los anuarios estadísticos de SERNAPESCA (2000, 2006).

A partir del año 2000 menos del 4% del desembarque pesquero se ha desglosado con las denominaciones vernaculares de lapa negra, reina y rosada, las cuales corresponden a las especies *F. latimarginata*, *F. maxima* y *F. pulchra* o *F. cumingi*, respectivamente (SERNAPESCA, 2003; Osorio, 2002; Bretos, 1988).

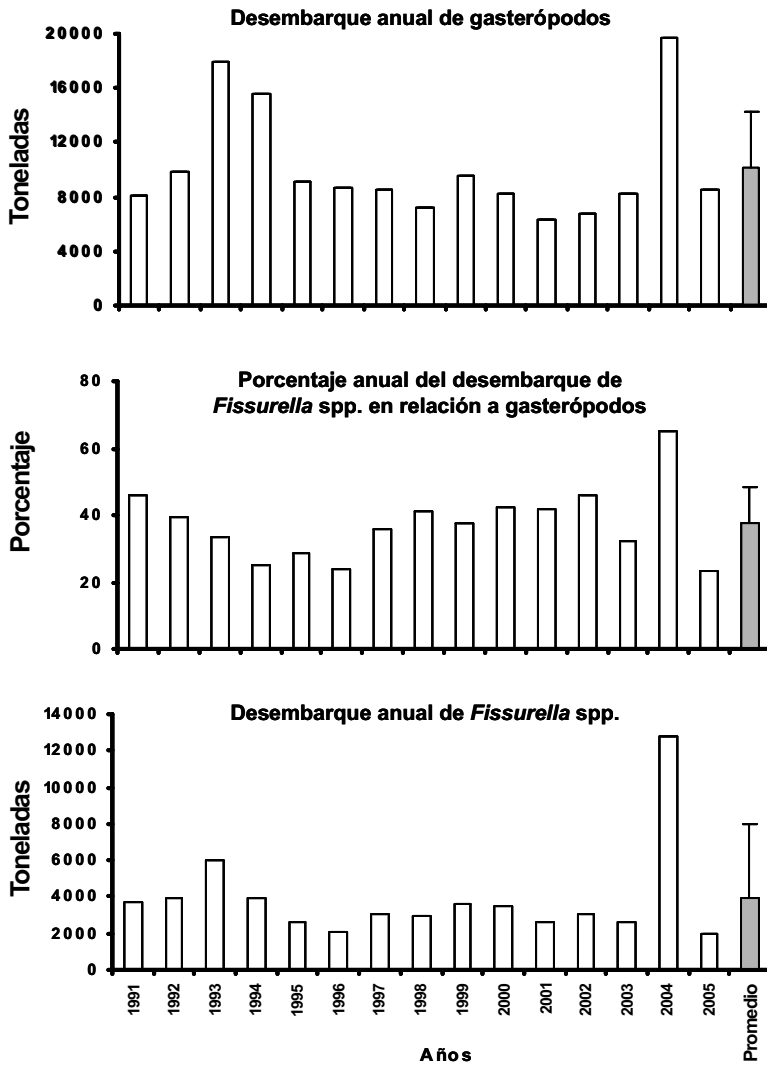


Figura 8. Promedio anual de desembarque de *Fissurella* y su relación con el total de gasterópodos.

Las distinciones entre las especies están fundamentadas en caracteres morfológicos, morfométricos y patrones de coloración de la concha, del pie, del manto y la cabeza, los cuales, a veces, suelen ser parecidos entre

organismos de especies diferentes (McLean, 1984; Oliva & Castilla, 1992, Guzmán *et al.* 1998). Además, los caracteres distintivos están con frecuencia enmascarados o deteriorados por los organismos epibiontes y normalmente la coloración del cuerpo se pierde después que el organismo ha sido extraído (Olivares *et al.* 1998). En consecuencia, la mayoría de los consumidores tiene dificultades o no sabe distinguir las diferentes especies, en el momento de adquirirlas como producto fresco entero o, más aún, como desconchado eviscerado.

Sin embargo, las capturas mayoritariamente se destinan a la industria pesquera, la cual procesa el pie muscular en la forma de fresco refrigerado, congelado y en conserva (Osorio, 2002). El procesamiento industrial provoca la pérdida total de los caracteres de las especies y resulta imposible la distinción.

El consumidor tiene preferencias particulares por algunas especies, respecto de otras, ya sea por el rendimiento de carne, consistencia o cualidades organolépticas del pie muscular. Ello ha intensificado la extracción de aquellas especies más apetecibles e, indirectamente, ha conllevado a expender suplantando el nombre de las lapas de mayor aprecio por el particular comprador; sobre todo teniendo en consideración que la mayoría de la población identifica a los ejemplares según nombres vernaculares, los cuales suelen variar entre distintas localidades y más aún para una misma especie entre localidades distintas. Actualmente, no existen normas que permitan controlar la identidad del producto que se comercializa, ni tampoco se han establecido metodologías que permitan reconocer la autenticidad de los productos presentes en el mercado.

La intensiva, sostenida y selectiva actividad pesquera ha desatado una sobreexplotación de las especies, con el resultado de que en todas ellas, la talla máxima y el tamaño promedio de los especímenes extraídos, ha ido disminuyendo notoriamente. Otras especies están siendo drásticamente



mergadas y en algunas localidades ciertas especies ya no se encuentran (Bretos, 1988; Olivares *et al.* 1988; Oliva & Castilla, 1992). Lo anteriormente descrito disminuye el potencial reproductivo de las especies, pone en riesgo la estabilidad de las poblaciones, altera la estructura de las comunidades y la organización y biodiversidad de los ecosistemas (Moreno & Jaramillo, 1983; Jara & Moreno, 1984; Oliva & Castilla, 1986). Sin embargo, pueden revertirse mediante programas de manejo del recurso así como con otros orientados a la repoblación.

Desafortunadamente, muchos de los aspectos biológicos y ecológicos se desconocen y entre ellos los genéticos, los cuales en conjunto deben proporcionar los fundamentos teóricos para implementar futuros programas de repoblamiento, así como también los de cultivo tendentes a la mejora genética y/o planes de mejoramiento genético. Uno de los pilares fundamentales para sustentar lo anterior es la identificación y caracterización molecular de secuencias de ADN, que permitan autenticar las diferentes especies y linajes y, en consecuencia, desarrollar metodologías de trazabilidad de la especie a lo largo de su ciclo vital o cadena de comercialización.

## **V. Los conceptos de especie y el proceso de especiación**

### **V.1. Concepto de especie**

El concepto de especie es difícil de definir, surgiendo inmediatamente varias interrogantes ¿Qué es una especie? ¿Cuáles serán los criterios para definir esa especie? ¿Hay límites precisos para agrupar de manera natural a los organismos vivos? ¿Es la especie la unidad natural?. El concepto más básico de especie es “Conjunto de organismos semejantes entre sí por tener uno o varios caracteres comunes”.

Dicho concepto fue el que primariamente prevaleció en Biología, desde Platón y Aristóteles hasta Linneo, para la definición de especies, correspondiendo a la definición tipológica o morfológica de especie. Linneo, mencionó “Contamos tantas especies como cuantas formas distintas fueron creadas en el principio”.

Al amparo del principio enunciado y desde una perspectiva muy general, toda población natural que sea morfológicamente distinta a otra debe considerarse como especie, de modo que la diversidad de patrones morfológicos se corresponde con una diversidad de especies en la naturaleza (Mayr, 1968). Indudablemente, esta definición tiene sus limitaciones de aplicación, porque en muchos casos una especie tiene formas diferentes y ocupa nichos ecológicos distintos en etapas distintas de su vida. Tampoco parece aplicable a especies gemelas, difíciles de distinguir por la amplia variabilidad individual intraespecífica, la que a veces supera a la variación interespecífica (Dobzhansky *et al.* 1980).

Otro concepto usado, basado en la sistemática permite definir a la especie como “uno de los grupos en que se dividen los géneros y que se componen de individuos que, además de los caracteres genéricos, tienen en

común otros caracteres por los cuales se asemejan entre sí y se distinguen de los individuos de las demás especies”.

Ninguna de esas definiciones anteriores, ni otras modernas han logrado suscitar el consenso de todos los naturalistas existiendo numerosos conceptos para definir especie. Así, se han establecido definiciones de especie en base a los conceptos de agamospecie, biológico, cladístico, cohesivo, especies compuestas, ecológico, evolutivo, concordancia genealógica, genético, cluster genotípico, Henning, internodal, morfológico, no dimensional, fenético, filogenético, politético, competencia reproductora, sucesional y taxonómico (Tinaut & Ruano, 2002).

Es posible que entre tantas definiciones se produzcan confusiones y conflictos, los cuales parecen incrementarse por nuevos conocimientos obtenidos de las poblaciones naturales mediante estudios ecológicos y moleculares (Mallet, 2001).

A continuación se presentan las definiciones más frecuentemente usadas:

Especie biológica: población natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines. La connotación del concepto lo hace inaplicable a organismos fósiles y tiene limitaciones respecto a organismos que se reproducen asexualmente, como varios animales y vegetales. Tampoco es aplicable para los casos de hibridación en los que se produce descendencia fértil y que permanecen como unidades genéticas y evolutivas independientes (Cain, 1970).

Especie evolutiva: es un linaje (una secuencia de ancestros y descendientes) de poblaciones u organismos que mantienen su identidad de otros linajes y que tiene sus propias tendencias históricas y evolutivas. Considera que ante la existencia de barreras geográficas o biológicas, el flujo genético entre las mismas será tan bajo, que se producirá una divergencia

genética. El concepto de especie evolutiva toma en cuenta que la evolución cladogenética puede ser reticulada, esto significa que aquellas poblaciones que inicialmente se separaron y que comenzaron a diverger genéticamente, pueden volver a entrar en contacto rompiéndose el aislamiento reproductivo y produciendo especies híbridas de las que emerge una nueva población que puede ser reconocida como unidad independiente (Wiley, 1978)

Especie filogenética: grupo irreducible de organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que además exhibe un patrón de ascendencia y descendencia. La especie se define a partir del nivel de soporte monofilético. Si este concepto fuera utilizado rigurosamente, poblaciones locales aunque ubicadas cercanamente entre sí serían consideradas especies diferentes debido a que cada población puede tener variantes genéticas moleculares únicas (Cracraft, 1983).

Especie ecológica: es un linaje o grupo de linajes íntimamente relacionados que ocupa una zona adaptativa mínima, diferente en su distribución de aquellas pertenecientes a otros linajes, y que además se desarrolla independientemente de todos los linajes establecidos fuera de su área biogeográfica de distribución. En esta definición la concepción de nicho y exclusión competitiva son importantes para explicar cómo las poblaciones pueden ser dirigidas a determinados ambientes y traer como resultado divergencias genéticas y geográficas fundamentadas en factores eminentemente ecológicos. El conjunto de recursos y hábitats explotados por los miembros de una especie constituyen el nicho ecológico de esa especie y no de otra por lo que, visto de otro modo, especie ecológica es un conjunto de individuos que explotan un solo nicho (Van Valen, 1976).

Concepto internodal: los organismos son coespecíficos por su pertenencia común a una parte de la red genealógica entre dos eventos de especiación o entre uno de especiación y uno de extinción (Kornet *et al.* 1995).

De acuerdo a los conceptos anteriores y con la información existente de las especies en estudio, es oportuno destacar que las especies del subgénero *Fissurella* de Chile, solamente se corresponden con el concepto morfológico, mediante el cual se le asigna una jerarquía taxonómica. Actualmente se desconoce si entre ellas existe aislamiento reproductivo total o parcial, las tendencias evolutivas, patrón de ascendencia y descendencia, nicho y exclusión competitiva.

## **V.2. Mecanismos de especiación**

Las especies no son inmutables y continuamente han estado y estarán desarrollando cambios y modificaciones que darán origen a otras nuevas. La variación que ocurre en el seno de las especies o poblaciones es la materia prima de la evolución, a partir de la que se va a crear toda la diversidad biológica (Puertas, 1999).

La especiación no sigue un patrón único, distinguiéndose, entre otros, los modelos básicos de especiación alopátrica y especiación simpátrica (Bush, 1975).

Especiación alopátrica, es la forma más clásica de especiación, siendo propuesta por Mayr (1968). En este modelo se postula que la continuidad de una población se interrumpe por barreras externas, originándose unidades poblacionales más pequeñas aisladas entre sí. El intercambio genético entre las unidades cesa y se da origen a la divergencia genética entre ellas, evolucionando hacia nuevas especies con el desarrollo de barreras intrínsecas de aislamiento reproductivo. La desaparición de la barrera original, permitirá que las especies entren en contacto, pero permanecerán aisladas reproductivamente y los mecanismos de selección incrementarán el aislamiento reproductivo entre ellas.

Se reconocen dos tipos de especiación alopátrica.

Especiación alopátrica vicariante, se produce cuando la población es dividida por la emergencia de una barrera física o por la extinción de poblaciones intermedias, quedando aisladas geográficamente sin posibilidad de que ocurra el flujo génico. El aislamiento potenciará la acumulación de diferencias morfológicas y genéticas hasta alcanzar la categoría de nuevas especies, estableciéndose los mecanismos de aislamiento reproductivo que le impedirán intercambiar material genético con las otras especies de su linaje.

Especiación alopátrica peripátrica, ésta implica la separación de una pequeña población de otra mayor, permaneciendo aislada de su población ancestral. Con el tiempo logrará tener una divergencia genética que la convierta en una nueva especie.

Las nuevas especies originadas por alguno de los dos mecanismos alopátricos pueden permanecer como especies alopátricas, aisladas geográficamente o también pueden convivir en una relación de simpatría, compartiendo un área física común, si el factor geográfico que inicialmente propició la evolución desapareciera.

El impedimento del flujo génico por las barreras externas favorece que los mecanismos estocásticos, como la deriva génica y la divergencia mutacional, permitan que los genomas de las poblaciones separadas lleguen a ser incompatibles (Turelli *et al.* 2001, Puertas, 1999).

En el Pleistoceno, los repetidos cambios climáticos alteraron significativamente los límites de distribución de muchas especies marinas por variaciones de los niveles del mar. Durante eventos de regresión muchas especies quedaron aisladas en los márgenes continentales y en respuesta a nuevas condiciones ambientales divergieron originando nuevas especies. En posterior transgresión quedaron compartiendo áreas comunes en una relación de simpatría (Roy *et al.* 1996; Avise, 1994).

En el ambiente marino las especies, en particular las litorales bentónicas, están representadas por poblaciones dispersas a lo largo de la costa, de modo que el flujo génico puede ocurrir entre poblaciones muy distantes. Para las especies de vida sésil o de escaso desplazamiento este flujo génico queda supeditado al poder de migración que tengan sus propágulos en las corrientes marinas, pero la existencia de barreras externas limita esta opción.

Una típica barrera extrínseca viene determinada por las características físicas del agua, con una temperatura más caliente en el ecuador y más fría en los polos, dando origen a una compleja circulación oceánica. Esos patrones incluyen una corriente ecuatorial que se mueve en dirección oeste y dos grandes centros de circulación en el hemisferio norte y sur del Océano Pacífico y del Atlántico. Estos centros de corrientes, favorecen que el flujo génico sólo ocurra dentro de sus márgenes ya que difícilmente los gametos, huevos, embriones y las larvas, podrán superar los límites de las corrientes (Palumbi, 1994).

Además, se ha descrito que el flujo génico entre poblaciones estaría limitado por la distancia que pueden recorrer los descendientes. En efecto, las larvas pueden desplazarse por medio de las corrientes a grandes distancias respecto del lugar donde están localizados sus progenitores, pero disponen de un tiempo limitado para este desplazamiento, determinado fundamentalmente por la potencialidad de sobrevivencia y del encuentro de un sitio con condiciones ambientales favorables para el asentamiento. Las larvas que se dispersan a mayores distancias aumentan el riesgo de ser desviadas a sitios desfavorables. Las larvas lecitotróficas están limitadas para recorrer grandes distancias porque pueden agotar sus reservas de alimento y no disponer de energía para la metamorfosis, a diferencia de las planctotróficas que no tienen esta limitación, siempre que se disponga de alimento en el medio (Palumbi, 1994; Hellberg, 1998). Estos factores que limitan el desplazamiento de los

propágulos de las poblaciones, pueden ser responsables del aislamiento genético de alguna de las poblaciones de una especie y en estas poblaciones se potenciará la presencia de la homocigosis alélica en detrimento de la heterocigosis que caracteriza a las poblaciones con flujo génico ilimitado (Avila & Malaquias, 2003)

La especiación simpátrica postula que la separación geográfica no es requisito para la eventual diferenciación y aparición de nuevas especies, sino que ocurre debido a presiones selectivas que empujan a una nueva población divergente a adaptarse a nuevos nichos ecológicos y a ocupar un nuevo hábitat o un nuevo huésped, como sucede en el caso de especies parásitas (Bush, 1969; Rice, 1987).

En gasterópodos litorales se ha observado que la presencia de barreras físicas no es condición necesaria para que ocurra la especiación y generación de nuevas especies a lo largo de la costa. Hay evidencias que indicarían que *Littorina saxatilis* estaría en vía de especiación, inferida por el desarrollo de barreras reproductivas entre poblaciones vecinas que ocupan espacios con microambientes diferentes en el área intermareal (Hellberg, 1998; Rolán *et al.* 2004).

### **V.3. Inferencia filogenética.**

La teoría de la evolución orgánica sustenta que todos los seres vivos, actuales y los del pasado, constituyen una comunidad de descendencia generada a partir de un ancestro común. Bajo esta teoría subyacen los mecanismos que intentan explicar cómo se forman los linajes, se conservan y transforman (Cecchi *et al.* 2001). Este planteamiento central de la teoría de la evolución fue expuesto por Charles Darwin en 1859 en su obra “El origen de las especies”, que para comunicar esta idea desarrolló la metáfora del árbol de la vida. En esta comparación, menciona que el rastro de las especies vivas



puede remontarse al pasado, hacia sus ancestros comunes, tal como en un árbol se separan dos ramas de una rama mayor (Baum *et al.* 2005). Éste ha sido el ideal de muchos científicos, llegar a reconstruir la historia evolutiva de todos los organismos de la tierra y expresarla en la forma de un árbol filogenético.

Se estima que lo ideal para reconstruir la historia de la vida es el registro fósil, el cual proporciona pruebas inequívocas de la pretérita existencia de un organismo. Desafortunadamente, no todos los seres vivos que poblaron nuestro planeta poseyeron cualidades corporales estructurales para la formación de fósiles, ni todos los ambientes tuvieron las características que permitieran la fosilización de los seres vivos. En este panorama, el registro fósil obtenido ha sido muy incompleto y además fragmentario, por lo cual los antecedentes obtenidos han permitido reconstruir parcialmente las relaciones entre los organismos vivientes. Otros métodos alternativos, como los estudios de la embriología, han permitido constatar que organismos de diferentes grupos comparten modelos comunes de origen y desarrollo de ciertas estructuras y órganos. Similarmente, la morfología y la fisiología comparada, han permitido determinar patrones de similitud entre la estructura y organización de órganos y sistemas, así como del funcionamiento de ellos entre animales de distintas categorías taxonómicas. Sin embargo, la historia evolutiva reconstruida ha sido siempre controvertida, porque los cambios evolutivos de los caracteres morfológicos y fisiológicos son complejos y con frecuencia aparecen expresiones intermedias del carácter, que no permiten asignarlos con exactitud a alguna categoría, dado que no siempre son objetivos ni tampoco son posibles de medir (Bush, 1975; Clarkson, 1986; Brooke & Holland, 2003).

Esta dificultad fue superada en la década de 1960, desde el momento en que Henning, considerado el creador de la llamada escuela cladística (sistemática cladística) y reconstrucción filogenética, estableció que la relación de los seres vivos debe realizarse en base a la distinción de los grupos

monofiléticos, considerando los caracteres homólogos compartidos (sinapomorfía). Un carácter es homólogo en dos o más taxa cuando es derivado del mismo carácter de su ancestro común más cercano y, por lo tanto, contiene información evolutiva (Cecchi *et al.* 2001).

## **VI. Filogenia molecular**

Al amparo del principio de caracteres homólogos se buscan marcadores moleculares que, estando presentes en una diversidad de seres vivos, permitan establecer relaciones de parentesco entre grupos de organismos. Mediante el análisis comparativo de secuencias de macromoléculas como las proteínas citocromo c, hemoglobina y ácidos nucleicos se han obtenido evidencias para realizar una aproximación parcial a la historia evolutiva de los metazoos, al menos, desde el filo Cnidarios al filo Cordados (Bergström, 1986). De entre ellas, el ácido nucleico es la de uso más generalizado, permitiendo un vertiginoso desarrollo de estudios de filogenia molecular en todos los reinos y grupos taxonómicos de seres vivos (Avice, 1994).

Aunque actualmente la filogenia molecular ha permitido inferir la historia evolutiva de una gran diversidad de grupos de organismos, esta metodología no ha sido aplicada a un importante grupo, como es el del subgénero *Fissurella* del Pacífico Sudoriental.

### **VI.1. Atributos del ADN**

Los más recientes avances en biología molecular, el desarrollo tecnológico y las modernas metodologías genómicas, han permitido aislar y secuenciar el ácido nucleico contenido en el núcleo, mitocondrias y cloroplastos. Las secuencias elucidadas han sido usadas para inferir las relaciones filogenéticas dentro y entre varios grupos taxonómicos, contando

con el apoyo de herramientas computacionales, fruto del desarrollo bioinformático.

Las metodologías basadas en el ADN han demostrado tener atributos más adecuados respecto a las metodologías de los caracteres morfo-fisiológicos e incluso proteínas. Estas particularidades radican en las características inherentes a la estructura, organización y función de la molécula de ADN (Nei & Kumar, 2000).

Todos los organismos existentes y extintos, tienen el ADN organizado con moléculas de pentosa (desoxirribosa), ácido fosfórico y bases nitrogenadas. Estas últimas son dos púricas; timina (T) y citosina (C) y dos pirimídicas; adenina (A) y guanina (G), cuyas cantidades y disposición lineal pueden variar entre los genes. El ADN no solamente tiene presencia universal, también es el depositario de toda la información estructural y funcional de los seres vivos, por lo que indudablemente contiene más información que cualesquiera de los caracteres morfológicos. Estas unidades de información llamadas genes, no solamente guardan codificadamente la información; también controlan y regulan la expresión de todos los caracteres y por ende cualquier cambio del carácter no es más que una consecuencia de una mutación del gen. Por otra parte se ha observado que las mutaciones a nivel de las bases nitrogenadas ocurren de una manera mas o menos regular, posibilitando la aplicación de modelos matemáticos para comparar las mutaciones entre organismos lejanamente relacionados, ya sea desde bacterias hasta humanos (Nei & Kumar, 2000).

## **VI.2. ADN mitocondrial**

La mitocondria es el orgánulo responsable de la respiración en los organismos eucariontes. Contiene su propio ADN (ADNmt), el cual es una molécula de dos cadenas de polinucleótidos (cadena ligera y cadena pesada), circular cerrada, a excepción de algunos hidrozooos en los que el ADN es una

doble cadena lineal. La molécula de ADNmt se autoreplica y existen múltiples copias en la matriz de la mitocondria. El ADNmt codifica para varias proteínas y diferentes ARN, en los metazoos tiene un tamaño relativamente pequeño variando entre 14 kb a 17 kb, debido a diferencias en las regiones no codificantes (Boore & Brown, 1994; Rollinson *et al.* 1998).

Los análisis realizados en diferentes especies de diversos grupos de metazoos han permitido establecer la organización, distribución y localización de los genes en el ADNmt. En general, el contenido de los genes del ADNmt es altamente conservado y no posee intrones. Los genes mitocondriales son los siguientes:

- 2 subunidades ribosomales, pequeña 12S y grande 16S
- 22 ARNt
- 13 subunidades de proteínas de la cadena respiratoria, las cuales son:
  - Citocromo oxidasa c, subunidades I-III (CO1 a 3)
  - Citocromo b, apoenzima (CYTB)
  - ATP sintetasa, subunidades 6 y 8 (ATPasa6 y ATPasa8)
  - NADH deshidrogenasa, subunidades 1 - 6 y 4L (ND1 a 6, 4L).

Además de los 37 genes, el ADNmt tiene regiones no codificantes, destacando la denominada región control. Esta región es de longitud variable y en diversos vertebrados e invertebrados contiene sitios de información para el control de los procesos de transcripción y replicación (Wolstenholme, 1992; Lee *et al.* 1995; Douzery & Randi, 1997; Yokobory *et al.* 2004).

Los genes mitocondriales se distribuyen siguiendo un patrón muy similar dentro del mismo filo, aunque con ligeras diferencias de orden entre algunas especies. El conservado patrón de distribución de los genes ha sido utilizado como un marcador para estudios de filogenia profunda a nivel de los mayores grupos, como en el filo Cordados y Artrópodos (Boore & Staton, 2002). En contraste a lo anterior, en el filo Moluscos, se ha comprobado una

mayor variabilidad en el ordenamiento de los genes, con grandes diferencias entre los grupos bivalvos, cefalópodos, gasterópodos, escafópodos y poliplacóforos. Además, se han detectado notables diferencias entre los grupos octópodos y decápodos y entre los gasterópodos pulmonados; motivo por el cual estas reorganizaciones del genoma mitocondrial parecen ser adecuadas para estudios filogenéticos intergenéricos (Yamazaky *et al.* 1997; Tomita *et al.* 2002; Dreyer & Steiner, 2004).

Por otra parte, se han observado alteraciones en el contenido génico en el ADNmt. Así por ejemplo, la pérdida del gen codificante para ATPasa8 ocurre en nemátodos y en el bivalvo *Mytilus edulis* (Boore & Brown, 1994). En oposición, la multiplicación de genes también aparece en algunas especies de reptiles, nemátodos, bivalvos y cefalópodos. En esta circunstancia, uno de los genes llega a ser funcional y los otros permanecen en estado de pseudogenes. Los genes duplicados son casi idénticos, sugiriendo que en las especies, ocurriría un proceso de evolución concertada, permitiendo homogenizar el contenido de los genes duplicados (Yokobori *et al.* 2004). Similarmente, la multiplicación de regiones intergénicas, no codificantes de aproximadamente 500 pb, se ha observado en el ADNmt de algunas especies de cefalópodos (Tomita *et al.* 2002).

Los estudios a nivel de los genes mitocondriales han demostrado que evolucionan de 5 a 10 veces más rápidamente que un gen de copia simple del ADN nuclear. Los genes mitocondriales y regiones distintas difieren en las tasas de mutación, proporcionando información adecuada del tiempo de la divergencia de los linajes. El ribosomal 12S y 16S tienen tasa de evolución reducida, y específicamente el 16S ha permitido elucidar las relaciones filogenéticas en grupos cuyo tiempo de divergencia se remonta a la época del Paleoceno (Bonnaud *et al.* 1994). Además, recientemente se ha observado que el CO1, es adecuado para evaluar relaciones en gasterópodos, cuyos fósiles

datan una edad aproximada de 400 Ma (Remigio & Hebert, 2003). Sin embargo, hay otros genes y regiones del ADNmt, como CO1, CYTB, ND1, región control, que poseen una alta tasa de evolución, resultando adecuada para estudiar las relaciones entre especies y poblaciones que han divergido entre los últimos 5 – 10 Ma y entender en parte los mecanismos de especiación (Brown *et al.* 1979; Douzery & Randi, 1997; Rollinson *et al.* 1998; Quinteiro *et al.* 2005)

En concordancia con todo lo anteriormente mencionado, el ADNmt es la molécula que actualmente ofrece las mayores ventajas para reconstruir historias filogenéticas y análisis de estructuras poblacionales, ostentando diversos atributos propios para ello.

Su pequeño tamaño de 14 a 16 kb, aunque hay excepciones como en el bivalvo *Placopecten magellanicus* con un ADNmt de 34 kb, facilita la determinación total de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADNmt. En el año 2002 se contaba con un registro de secuenciación de ADNmt para 56 especies de invertebrados marinos (Boore & Staton, 2002) y entre ellos solamente figuraban cuatro gasterópodos: los pulmonados *Albinaria coerulea*, *Cepaea nemoralis*, *Euhadra herklotsi* y el Opisthobranquio *Pupa strigosa* (Hatzoglou *et al.* 1995; Terrett *et al.* 1996; Yamazaki *et al.* 1997; Kurabayashi & Ueshima, 2000), pero actualmente en el GenBank, figura un registro de ADNmt para 12 especies de moluscos gasterópodos (1 eogastrópodo, 5 ortogastrópodos, 3 opisthobranquios y 3 pulmonados), lo cual pone en evidencia el gran vacío y desconocimiento existente en este grupo de moluscos.

Otra peculiaridad del ADNmt, es la transmisión vertical vía materna, con lo cual la descendencia se puede considerar equivalente a un clon materno, aunque en algunas especies de *Mytilus* existe transmisión paterna y materna del

ADNmt (Quesada *et al.* 1996; 2003) y sin presentar, generalmente, recombinación (Rollinson *et al.* 1998).

La tasa de evolución de los genes mitocondriales es relativamente constante y su correlación con el tiempo de divergencia, permite su uso como un reloj molecular para estimar la edad y períodos de radiaciones de las especies, las poblaciones o linajes (Quinteiro *et al.* 2001; Bromham & Penny, 2003).

Actualmente, existe una gran cantidad de estudios sobre filogenia molecular, inferida desde las secuencias de bases de los genes mitocondriales, en todos los reinos de seres vivos. En metazoos, han abarcado desde las relaciones existentes al interior de los filum hasta los intragenéricos; pero aún quedan muchos grupos que por alguna circunstancia no han sido objeto de estudio. Entre estos, en la familia Fissurelloidea el género *Fissurella* es un ejemplo de lo citado.

### **VI.3. Mutación.**

Las principales transiciones evolutivas, desde procariontes a vertebrados, se han producido por aumento en la complejidad genómica principalmente por duplicaciones a gran escala de los genes preexistentes. Similarmente, la transferencia lateral de genes entre especies (mediada por transposones) permite la propagación de genes transespecíficos y parece ser un fuerte impulsor de la evolución de los seres vivos. Por otra parte, cambios en las vías de regulación de los genes homeóticos pueden alterar drásticamente el desarrollo y generar innovaciones morfológicas (Vergara, 2002; Gallardo, 2003). Los antecedentes anteriores permitirían generalizar que las diferentes modificaciones que muestran los organismos, en alguno de sus niveles de organización y de funcionalidad, corresponden a expresiones de cambios que suceden primariamente en el genoma, en el cromosoma o en el gen del

organismo y que en estas mutaciones subyacen los mecanismos de especiación y evolución.

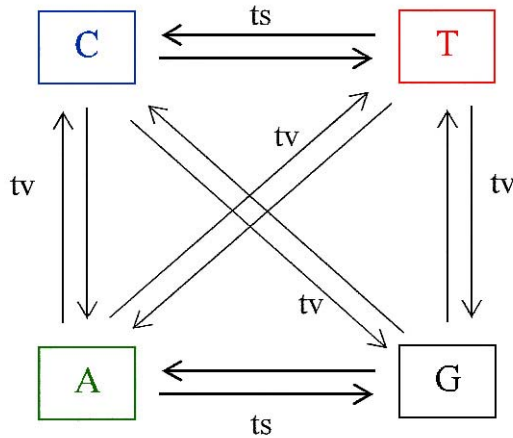
Entre las mutaciones que ocurren a nivel del gen, se han descrito aquellas que involucran la duplicación de un segmento del gen; la inversión que produce un giro de 180° del segmento génico y la transposición que ocasiona el cambio de posición del segmento del gen o bien la inserción en otro gen. En la inserción de un segmento del ADN, suelen estar involucrados transposones o elementos transposables (segmentos cortos de ADN, con capacidad de autorregular su transcripción e inserción en los genes) los cuales también favorecen la transferencia horizontal de genes (Nei & Kumar, 2000).

En adición a las mutaciones anteriormente señaladas, están las que se producen en la estructura primaria del ADN, con lo cual se pierde la secuencia original de nucleótidos en el sitio donde ocurrió la mutación. Si estas mutaciones se transmiten a generaciones siguientes entonces, la descendencia adquirirá el estado modificado del carácter (sinapomorfia), el cual será de utilidad para un eventual estudio de filogenia molecular.

#### **VI.4. Mutación puntual del ADN**

La secuencia original de los nucleótidos del ADN puede modificarse por diversos mecanismos. Uno de ellos corresponde a la sustitución de bases, considerada como la forma más simple de mutación. Esta sustitución consiste en un intercambio de una base por otra. Las sustituciones que involucran un cambio de una base púrica por la otra, o una pirimídica por otra pirimídica se llaman transiciones. Las que implican intercambio de una base púrica por una pirimídica y viceversa se denominan transversiones (Nei & Kumar, 2000). La Figura 9 muestra estos tipos de sustituciones





**Figura 9. Tipos de sustituciones de nucleótidos. ts: transición; tv: transversión**

El otro mecanismo consiste en inserción – delección de bases. En la inserción se produce la incorporación de una o varias bases a la cadena original y la delección tiene como consecuencia la pérdida de una o más bases. Además, se producen inversiones de nucleótidos, comprometiendo a uno o más de ellos, como una unidad; la cual cambia de posición en la cadena (Nei & Kumar, 2000).

El efecto de estas mutaciones, sobre todo en los genes codificantes para proteínas, puede ser de amplio espectro porque alteran la pauta de lectura de la secuencia de los nucleótidos, siempre que no sean múltiplos de tres. Así, la más dramática será la que produce una mutación sin sentido, generándose un codón de término, el cual detendrá prematuramente la síntesis de esa proteína en particular. Otra posibilidad es la generación de una mutación no sinónima, y el nuevo codón codifique para un aminoácido de distinto tipo al inicial (Ej: ácido en vez de básico) y la proteína altera su función. Por otra parte están las mutaciones sinónimas o silenciosas, en las cuales el cambio producido en el

triplete da origen a un codón que codifica para el mismo aminoácido (Nei & Kumar, 2000).

La identificación de este tipo de mutaciones suelen ser de gran utilidad para reconocer adecuadamente el grado de divergencia entre secuencias homólogas.

## **VI.5. Estimación de las distancias genéticas**

Las secuencias primarias del ADN provenientes de un ancestro común, divergen gradualmente en el tiempo por la sustitución de nucleótidos. Estas sustituciones se pueden estimar, permitiendo obtener la tasa de divergencia entre ellas. Las sustituciones se expresan en número absoluto o como porcentaje de sustitución por sitio. Sin embargo, no todos los sitios del ADN tienen la misma susceptibilidad a los cambios, lo cual está más magnificado en el ADN que codifica para proteínas, el que presenta varias regiones como la de flanqueo, codificante, exones e intrones, secuencias repetitivas, región reguladora y no reguladora y posiciones del codón.

Nei & Kumar (2000), mencionan diferentes modelos matemáticos frecuentemente usados para la estimación porcentual de sustituciones o distancias nucleotídicas entre las secuencias homólogas, las cuales toman en consideración la mayor o menor susceptibilidad de un sitio a la mutación.

Modelo de Jukes y Cantor, en este método de un parámetro se asume que cada nucleótido tiene la misma probabilidad de sustitución y se presenta con igual frecuencia en un mismo período de tiempo (1 año).

Modelo de Kimura, método de dos parámetros, toma en consideración que las sustituciones por transición son más frecuentes que las de transversión.

Modelo de Tajima y Nei, esta estimación considera los sitios que parecen ser más sensibles o insensibles a los factores perturbadores o mutacionales.

Modelo de Tamura, considera que los nucleótidos no tienen la misma tasa de sustitución y no son iguales unos a otros. Además, el contenido de GC frecuentemente es distinto a 0,5.

Modelo de Tamura y Nei. En este modelo se considera la transición – transversión y el contenido de GC.

Distancia Gamma, a diferencia de los modelos anteriores asume que la sustitución de los nucleótidos no es la misma para todos los sitios. Mediante análisis estadísticos se ha inferido que la tasa de variación sigue una distribución tipo gamma, lo cual ha derivado en la formulación de métodos matemáticos gamma basados en la estimación del parámetro  $\alpha$  de dicha distribución. Otro parámetro a incorporar en los modelos evolutivos es la proporción de sitios invariables.

## **VI.6. Árbol filogenético**

Constituye una representación gráfica de las relaciones de parentesco (ancestro-descendiente) inferidas entre las secuencias.

En un árbol se distinguen los nodos terminales, correspondientes a las unidades a comparar. Estas unidades reciben el nombre de unidades taxonómicas operacionales (OTUs), representando a cualquier categoría taxonómica como pueden ser especies, géneros, orden, etc. Los nodos internos son los puntos a partir del cual emergen las ramas que comunican los nodos divergentes de un ancestro común y por lo tanto indicarían un evento de especiación; también reciben el nombre de unidades taxonómicas hipotéticas (HTUs). Las ramas describen las relaciones entre ancestros y descendientes y entre nodos.

La topología del árbol depende básicamente de las disposiciones de las ramas en el plano y de las conexiones entre nodos. El número de ramas se incrementa con el número de taxa o secuencias comparadas.

Hay dos tipos de árboles, uno corresponde al árbol con raíz o enraizado, comúnmente inferido para estudios de relaciones evolutivas. Este árbol incorpora un grupo externo, que tiene una relación más distante con cada una de las unidades en estudio y no pertenece al grupo sometido a análisis. En el punto de la rama externa del árbol donde el grupo externo establece contacto, se puede inferir la posición de la raíz y ubicar el ancestro común de todo el conjunto de unidades taxonómicas, motivo por el cual se le considera como un árbol filogenéticamente verdadero. La dirección y la longitud de cada brazo corresponden a la distancia evolutiva y puede también indicar el tiempo de divergencia entre los OTUs.

Otro tipo de árbol se denomina sin raíz o árbol no enraizado, el cual solamente permite detectar las relaciones entre grupos, pero no la dirección de la evolución, ni la identificación del ancestro común.

El número de topologías de árboles a inferir aumenta con el número de secuencias y a igual número de ellas, siempre es mayor en la condición de enraizados (Nei & Kumar, 2000).

## **VI.7. Métodos de reconstrucción de árboles**

La reconstrucción de árboles filogenéticos se realiza a partir de secuencias perfectamente alineadas, mostrando el máximo valor de homología. La optimización de alineamientos de secuencias múltiples se realiza mediante programas computacionales, siendo más frecuentemente utilizado el método de CLUSTAL. Luego, estas secuencias alineadas son usadas para inferir el árbol, mediante métodos de construcción de árboles, disponiéndose en la actualidad de varias metodologías basadas en distancia, parsimonia y verosimilitud, incorporados y aplicados a datos reales desde 1960 (Sanderson & Shaffer, 2002; Felsenstein, 2004; 1988; Swofford *et al.* 1996).

Métodos de distancia, estos métodos crean una matriz de distancias nucleotídicas, entre pares de secuencias, y construyen el árbol agrupando las secuencias que tienen la menor distancia entre ellas. Entre estos metodos se encuentran UPGMA (“método de pares agrupados usando promedio aritmético”) y Neighbor-Joining, “vecino más próximo” (NJ), éste último es el usado con más frecuencia, permitiendo ligeras variaciones locales de la tasa evolutiva.

El método NJ utiliza la matriz de distancia para elaborar el árbol. Básicamente consiste en ir agrupando en pares sucesivos las secuencias que tienen la menor distancia evolutiva. El algoritmo de NJ parte con un árbol estrella, en el cual se asume que no hay agrupaciones de OTUs y todos los nodos irradian desde un nodo central. Luego, de entre todas las secuencias, se detecta el par que tenga la distancia más pequeña agrupándolo como una unidad neighbor (OTU). A continuación, esta pareja se considera como una nueva unidad y se construye otra matriz, de la cual se escoge la pareja que tenga la menor distancia, y así sucesivamente. En cada etapa, dos nodos terminales son reemplazados por uno interno y termina cuando los dos nodos remanentes se unen por una rama. La comparación con otros métodos demostró que NJ es muy eficiente y con confiabilidad para estimar la longitud de los brazos, pero no demostró ser el más parsimonioso (Saitou & Nei, 1987).

El método de UPGMA es más simple. Asume que las tasas de evolución son aproximadamente constantes entre las diferentes secuencias (linajes), de modo que existiría una relación aproximadamente lineal entre distancia de evolución y tiempo de divergencia. Existiendo una tasa constante de divergencia de las secuencias, las longitudes de las ramas del árbol pueden considerarse como medidas de un reloj molecular. También, tiene una propiedad aditiva lo que implica que la suma de las longitudes de las ramas que conectan dos nodos cualesquiera, es la distancia entre cualquier par de nodos.

Estas asunciones no siempre se cumplen, usándose preferentemente otros métodos más fiables y robustos.

EL método de Maximun parsimony, “máxima parsimonia” (MP), se basa en el estado del carácter (nucleótido) y busca el árbol que pueda explicar las secuencias observadas con el mínimo número de sustituciones. Selecciona árboles que minimicen la longitud total del árbol, en base al número de transformaciones desde un estado del carácter a otro requerido para explicar las diferencias de un conjunto de secuencias. El método trata cada sitio independientemente y después agrega los números de sustituciones necesarias para todos los sitios.

A diferencia de los métodos de distancia, los de máxima parsimonia asignan un costo a un árbol dado y buscan a través de todas las posibles topologías de árboles, hasta encontrar el árbol con el menor costo. No obstante, el método a menudo encuentra más de un árbol que cumple con el requisito de costo y a veces es inconsistente cuando la tasa de evolución difiere entre linajes (atracción de las ramas largas) (Felsenstein, 1978).

El método de Maximun likelihood, “máxima verosimilitud” (ML), busca la topología del árbol que tenga el máximo valor de verosimilitud de entre todos los posibles árboles. El modelo ha sido ampliamente usado porque permite análisis filogenéticos basados en modelos de evolución molecular preespecificado. De este modo, dado un árbol de una particular topología, el método permitirá encontrar la probabilidad de que el árbol haya emergido de la matriz de datos elaborada. La probabilidad de tal árbol es computada mediante un modelo estadístico sobre sustituciones en los sitios en un proceso evolutivo, asumiendo que la sustitución en un sitio particular ocurre independientemente de cualesquier sustitución en otro sitio, evaluando luego la verosimilitud de la topología para cada uno de los árboles. El método no resulta adecuado para análisis sobre 20-30 especies. Requiere mucho tiempo en el proceso de

computación para la probabilidad de todas las topologías posibles (Felsenstein, 1981; Nei & Kumar, 2000).

Indudablemente cada metodología de reconstrucción de árbol tiene sus ventajas y desventajas y ante la necesidad de elección se han propuesto algunos parámetros para elegir el método más adecuado. Estos parámetros son: la exactitud, concebida como el tiempo empleado por el método para encontrar el árbol más probable; la eficiencia, entendida como el número de sitios nucleotídicos o caracteres necesarios para que un método encuentre un árbol aceptable; la consistencia, que es la capacidad de un método para converger en un árbol correcto dada una cantidad infinita de sitios y, por último, la robustez del método, que es la capacidad para converger en un árbol correcto, aún cuando algunos de sus principios no se cumplan (Penny *et al.* 1992). Una alternativa opuesta a la elección, considera que en ausencia de un método para inferir fielmente la filogenia real, lo recomendable es evaluar todos los métodos entre sí, empleando el mismo set de información y teniendo en consideración que el principio de máxima parsimonia lo usan todos los métodos (Saitou & Nei, 1987). En la práctica esta sugerencia ha prevalecido y en los últimos años los estudios sobre inferencias evolutivas se han realizado empleando las metodologías de NJ, MP y ML (Liu & Hershler, 2005; Yoon & Kim, 2005).

La reconstrucción filogenética es una inferencia estadística de un único árbol verdadero de la realidad evolutiva de las especies, el cual se desconoce. En esta inferencia se debe estimar la longitud de las ramas y la topología del árbol. Sin embargo, el principal problema es estimar la topología, ya que la cantidad de árboles inferidos incrementa drásticamente con el número de secuencias y solamente uno o algunos podrían coincidir con el verdadero. Para resolver este problema se disponen de pruebas estadísticas que permiten evaluar qué árbol tiene mayores probabilidades de ser el verdadero para representar la realidad (Nei & Kumar, 2000).

## VI.8. Test estadístico para topologías de árbol

La probabilidad de un árbol filogenético para representar la realidad se puede evaluar mediante pruebas estadísticas, que permiten estimar la fiabilidad y robustez de la topología obtenida y de cada uno de los nodos. Estas metodologías estadísticas se conocen como “bootstrap”, “jackknife” y “error estándar de la longitud de las ramas de un árbol” (Swofford *et al.* 1996; Felsenstein, 1985; 1988; 1995; 2004).

Entre todas las nombradas, la usada con mayor frecuencia para datos moleculares es el método de “bootstrapping” o replicación, la cual es una metodología de remuestreo, para determinar si los clados obtenidos en un árbol filogenético son soportados con fiabilidad o producidos por coincidencia con el azar. La premisa básica del método consiste en asumir la variabilidad de una distribución obtenida (árbol) procediendo a realizar remuestreos, con reemplazamiento del carácter, desde la misma matriz de datos de secuencias alineadas considerando a cada sitio (carácter) como una unidad de muestreo. Estas réplicas dan origen a nuevos conjuntos de datos pseudoreplicados del mismo tamaño del original. Los árboles resultantes, de entre 100 a más réplicas, son resumidos en un árbol consenso, con un valor de bootstrapping. Este valor es un indicador de la probabilidad de recuperar en repetidos muestreos el clado verdadero, desde una muestra real del mismo tamaño. El método analiza los parámetros de topología del árbol, longitud de las ramas y proporción total de sustituciones/transversiones. En muchos casos, los investigadores están más interesados en la topología de las porciones del árbol que en la del árbol total (Felsenstein, 1985; Sanderson & Chaffer, 2002). Los métodos de NJ y MP permiten calcular para cada rama del árbol la distancia evolutiva, que representa el número estimado de sustituciones por sitio. Desde estas distancias se calcula el error estándar evaluando de esta forma el nivel de confianza (Nei *et al.* 1985; Takahata & Tajima, 1991; Felsenstein, 1985).



La implementación de las metodologías computacionales sumada al desarrollo de metodologías de amplificación y secuenciación del ADN, posibilitaron el explosivo crecimiento de estudios de filogenia molecular. La fuente primaria de obtención de datos moleculares son los ácidos nucleicos, nucleares y extranucleares, en cuyas secuencias ha quedado registrada la historia evolutiva de cada uno de los organismos vivientes actuales y extinguidos.

## Planteamiento del problema

La región de aguas templadas del Océano Pacífico Sudoriental, comprendida entre el Golfo de Guayaquil (3-4° S) y el extremo sur del continente, incluye las provincias faunísticas Peruviana y Magallánica, con una zona templada transicional entre ambas. El clima de esta región, está fuertemente influenciado por la corriente de Humboldt, la cual determina la alta productividad de estas aguas del Pacífico, con una gran diversidad de especies, algunas de las cuales son endémicas para cada una de las provincias y muchas de ellas se superponen en la zona de transición.

La riqueza de esta zona ha sido explotada desde el momento en que el hombre arribó a estas costas (11.000 AP), y la evidencia ha quedado registrada en los denominados conchales. Entre las especies explotadas están las pertenecientes al género *Fissurella*, un grupo de moluscos gasterópodos denominados popularmente “lapas”, cuya peculiaridad es poseer un pie muscular muy desarrollado protegido por una concha de amplia abertura ventral y provista de un orificio en la parte dorsal.

Las especies de *Fissurella* coexisten en simpatria, habitando el sustrato rocoso de la zona intermareal media y baja y la zona submareal, son consumidores primarios y se alimentan de macroalgas. A partir del año 1984, se identifican 13 especies (*F. peruviana*, *F. maxima*, *F. limbata*, *F. pulchra*, *F. bridgesii*, *F. cumingi*, *F. latimarginata*, *F. costata*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. oriens*, *F. picta* y *F. radiosa*). La identificación está fundamentada en los caracteres de la concha tales como morfología, coloración, diseño y tamaño, y el color del pie. Sin embargo, anteriormente, las mismas especies en consideración a los caracteres de la concha y del pie, fueron denominadas con 58 nombres específicos. Los caracteres tipológicos son ampliamente variables a nivel interespecífico y con frecuencia algunas formas de una especie son semejantes a los de otra especie. También, los caracteres varían con la edad

(tamaño) y en los juveniles suelen ser muy parecidos entre las especies, lo cual limita el uso de las claves de identificación a los animales adultos. Adicionalmente, la concha tiene una estructura que otorga una superficie muy favorable para la fijación de una serie de organismos epibiontes, los cuales encubren y deterioran los caracteres tipológicos.

Evidentemente la denominación de especies del género *Fissurella*, sustentada en los variables caracteres fenotípicos, ha generado controversias y las especies actualmente reconocidas no están al margen de discrepancias, ya que su identificación se realiza empleando los mismos controvertidos, variables e inestables caracteres corporales, morfológicos, estructurales y de diseño de la concha. Últimamente, estudios realizados con microscopía electrónica ponen en evidencia diferencias existentes en la ultraestructura del núcleo del espermatozoide entre las especies *F. crassa*, *F. latimarginata* y *F. cumingi*, los cuales podrían ser de valor taxonómico y permitirían validar la categoría de esas especies. Sin embargo, la validación de las especies no ha contado con el sustento de estudios moleculares, los cuales han demostrado tener el mayor grado de precisión en la determinación taxonómica y en la asignación de individuos a taxa concretos. Ante el relevante problema de identificación de estas especies, se ha estimado pertinente utilizar las técnicas de biología molecular, basadas en la amplificación (PCR) y secuenciación de genes, para determinar e inferir las relaciones entre los haplotipos de genes mitocondriales y secuencias nucleares, aislados desde los fenotipos característicos de cada especie morfológica de *Fissurella*.

Por otra parte, las especies de *Fissurella* de esta región del Pacífico alcanzan los mayores tamaños registrados para las especies de este género en el mundo y su músculo es una carne que tiene una gran demanda en el mercado local e internacional. Se exceptúa de esto a *F. peruviana* que es la más pequeña, los ejemplares de mayor tamaño, no sobrepasan los 31 mm y no

existen evidencias sobre su consumo. Por ello, los fisurélidos sustentan una pesquería artesanal que en los últimos 15 años registra un desembarque promedio anual cercano a las 4.000 toneladas. No hay registros sobre el stock poblacional de las especies, existiendo desconocimiento de la cantidad de recurso que se puede extraer. La captura de los organismos se realiza durante todo el año y la única medida de protección de estas especies consiste en la fijación de una talla mínima de extracción (60 mm). Las capturas se destinan al consumo humano, comercializándose en estado fresco entero o desconchado, crudo o cocido; también congelado y en conserva. Las diferentes formas de procesamiento del animal producen la pérdida de todos los caracteres específicos y en consecuencia resulta imposible identificar la especie comercializada. Adicionalmente, el público consumidor tiene preferencias por determinadas especies, lo cual produce un incremento del esfuerzo pesquero sobre las especies más apetecidas y merma al límite del exterminio a algunas poblaciones, en determinadas localidades. Paralelamente, existe la tendencia a suplantar una especie por otra con el consiguiente perjuicio al consumidor. Con la finalidad de sustentar la idoneidad del producto comercializado, en este estudio se diseñará una metodología basada en la amplificación (PCR) de un gen mitocondrial seleccionado y posterior uso de enzimas de restricción. El perfil de restricción permitirá detectar un patrón característico mediante el cual se autentificará la especie de *Fissurella*. En adición, esta misma metodología, será de utilidad para apoyar cualquier tipo de estudio de biología y pesquería que se realice con especies de *Fissurella*.

Entre otros aspectos desconocidos sobre los fisurélidos de Chile están los concernientes al origen, radiación y evolución de estas especies en el Pacífico Sudoriental. Los fósiles hallados, señalan que uno de los registros más temprano de *Fissurella* está en depósitos de localidades ubicadas en el Norte de Chile (Antofagasta-Mejillones), con edad asignada a la época del Plioceno.

Según el aspecto de las costillas de la concha, uno de estos fósiles corresponde a la especie *F. crassa* y otro es similar a *F. maxima*, las cuales existen en la actualidad. Otros hallazgos dan cuenta de la presencia de las especies extintas *F. lebuensis* y *F. chica* en la zona centro del país (Lebu), durante el Mioceno, cuya morfología de la concha no coincide con las especies existentes. La escasez y discontinuidad del registro fósil no permite hacer un seguimiento de la radiación y especiación de las lapas, a lo largo de la costa de Chile.

Las especies actuales de *Fissurella* se han congregado en tres grupos, en base a la relación del grosor entre la capa aragonítica y calcítica de la concha, pero esta agrupación no se corresponde con características de homología y por lo mismo no refleja relaciones de parentesco, ni evolutivas de las especies. Los estudios morfológicos existentes no permiten detectar los caracteres homólogos y difícilmente diferenciarlos de aquellos homoplásicos, lo cual hace muy poco probable reconstruir la historia evolutiva de las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental. En ausencia de caracteres morfológicos y registros fósiles adecuados, en el presente estudio se realizará una reconstrucción de la historia evolutiva de *Fissurella* de Chile en base a filogenia molecular sustentada en las distancias evolutivas de secuencias de genes mitocondriales y nucleares.

Las distintas especies de *Fissurella* se distribuyen en poblaciones discretas a lo largo de la costa de Chile y es altamente probable que en ausencia de barreras físicas haya un libre flujo génico entre todas las poblaciones. Sin embargo, aunque los animales tienen muy poca capacidad de desplazamiento, no hay antecedentes sobre biología poblacional, ni de la potencial capacidad de migración de los animales. En el presente estudio se realizará una evaluación indirecta de nivel de flujo génico y del grado de aislamiento reproductivo entre cada una de ellas. Estos datos son de vital importancia para la gestión sostenible y racional de este recurso pesquero.

## Hipótesis

La única y elevada diversidad de especies del género *Fissurella*, en el litoral del Pacífico Oriental, debe tener su origen en peculiares condiciones oceanográficas y paleoclimáticas de la región, y eventos de tectónica de placas. Tales procesos son los factores determinantes de los patrones de diversidad observados y de la historia evolutiva de dichas especies. Tanto la distribución actual como el registro fósil sugieren un origen atlántico del género, por ello la presencia de dicho género en el Pacífico Este, requeriría de una colonización a través del Istmo de Panamá con anterioridad a su elevación durante el Plioceno.

La generalizada ausencia en el medio marino de barreras extrínsecas limitantes del flujo génico, conlleva la frecuente ausencia de diferenciación genética entre poblaciones marinas. Sin embargo, la amplia y dispersa distribución latitudinal de las poblaciones de las especies de *Fissurella*, a lo largo de 4.300 km de costa, la escasa duración de la etapa plantónica, la escasa movilidad en su fase bentónica, la unidireccionalidad de las principales corrientes costeras, la existencia de estructuras hidrográficas de media escala, como los eventos de afloramiento y las condiciones oceanográficas asociadas al Niño, son factores que pueden modificar patrones generalizados asumidos para el medio marino.

## Objetivos

1. Caracterización de la secuencia parcial nucleotídica de los genes mitocondriales del citocromo b, subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa y ARNr 16S, y de los genes nucleares los espaciadores internos ITS1 e ITS2 del complejo ribosomal ARNr 18S-ITS1-ARNr 5.8S-ITS2-ARNr 28S y la histona H3 del subgénero *Fissurella*.
2. Descripción de patrones de RAPDs para una muestra de individuos, de cada una de las especies consideradas del subgénero *Fissurella*.
3. Inferencia de las relaciones filogenéticas entre las especies consideradas del subgénero *Fissurella* con distribución en el Pacífico Sudoriental.
4. Evaluación del grado de congruencia entre la taxonomía y sistemática, establecida en base a caracteres morfológicos, y las relaciones evolutivas inferidas a partir de datos moleculares.
5. Definición de los procesos filogeográficos responsables de los patrones evolutivos inferidos, para las especies del subgénero *Fissurella* de la costa de Chile.

6. Análisis de la estructura genética poblacional en diversas especies representativas del subgénero *Fissurella*, a partir de muestras de poblaciones localizadas a lo largo de la costa de Chile.

7. Definición de un protocolo de identificación genética de las especies del subgénero *Fissurella* destinadas al consumo, a partir de muestras de productos comerciales frescos, congelados y procesados térmicamente, para su aplicación en el control alimentario.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## I. Área de muestreo

Las especies consideradas en este estudio provienen de cuatro áreas geográficas diferentes.

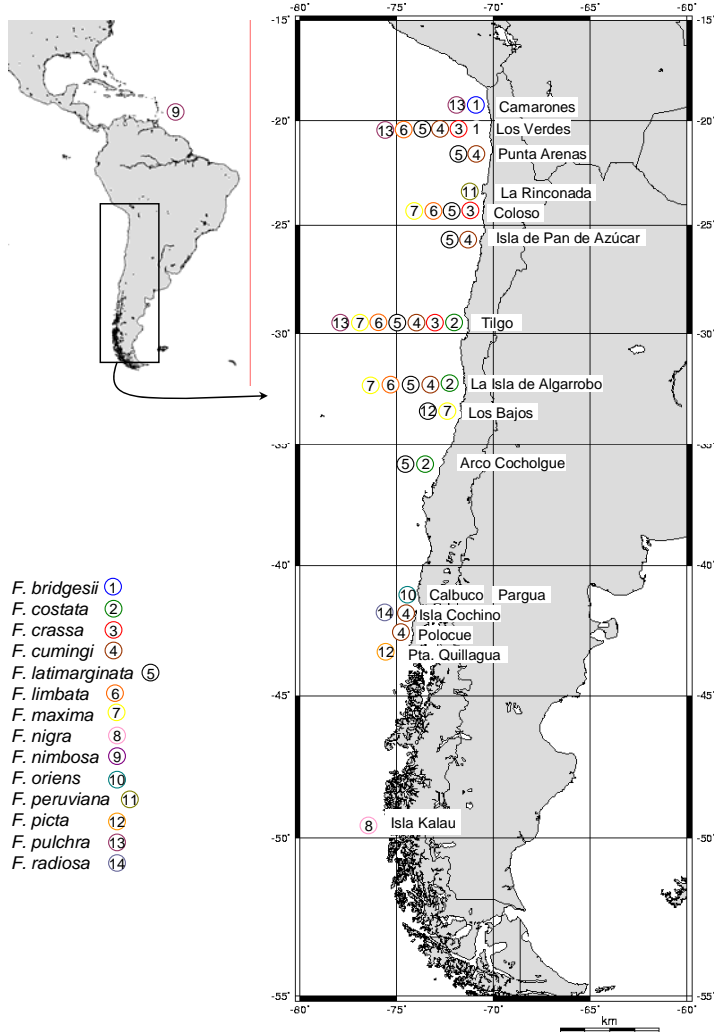


Figura 10. Mapa indicando las localizaciones de las áreas de muestreo para cada una de las especies del subgénero *Fissurella* de Chile.

Los ejemplares de *Fissurella*, lapa chilena, fueron recolectados en el área que corresponde a la zona rocosa del litoral costero comprendido entre los 19° y 50° de latitud sur (Figura 10), desde la zona intermareal media e inferior y de la zona submareal hasta una profundidad no superior a los 20 m, zonas de hábitat de estas especies. En las zonas antes citadas, las poblaciones están separadas por playas o pozas de arena y los individuos se encuentran habitando sobre la superficie, bordes, grietas u oquedades de las rocas; o al amparo de las frondas de las macroalgas *Lessonia nigrescens* y *Durvillaea antarctica*, dependiendo de la especie.

Los ejemplares de la especie *Fissurella nimbose* Linnaeus, 1758 única especie tropical del Caribe dentro del subgénero *Fissurella*, se obtuvieron de la costa de Venezuela y los de la especie *Fissurella schrammii* Fischer, 1857 provienen de la región tropical de las islas de Cabo Verde en el Atlántico Este.

De las zonas rocosas del puerto de Aguiño en la provincia de A Coruña (Galicia, España), se recolectaron ejemplares de la especie *Diodora graeca* Linnaeus, 1758 perteneciente a la subfamilia *Diodorinae* (Fissurelloidea) y *Haliotis tuberculata* Lamarck, 1822 (Haliotidae), los cuales fueron considerados como grupos externos del género para permitir la polarización de los caracteres y enraizar los árboles filogenéticos.

## II. Localidades de colecta

Los ejemplares de cada una de las especies consideradas en el presente estudio, provienen de diferentes poblaciones ubicadas en las localidades que se indican en la Tabla 14.

**Tabla 14. Localidades de colecta de los ejemplares de las diferentes especies, sus coordenadas geográficas y el código de identificación.**

Especie	Localidad	Coordenadas		Código
		Latitud	Longitud	
<i>F. bridgesii</i> Reeve, 1849	Caleta Camarones	19° 12' S	70° 17' W	FBRInCA
	Los Verdes (Iquique)	20° 27' S	70° 12' W	FBRIn
<i>F. costata</i> Lesson, 1831	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FCOSnTI
	La Isla de Algarrobo	33° 21' S	71° 41' W	FCOSnAI
	Arco Cocholgue	36° 35' S	72° 58' W	FCOSnTC
<i>F. crassa</i> Lamarck, 1822	Los Verdes (Iquique)	20° 27' S	70° 12' W	FCRAnI
	Coloso (Antofagasta)	23° 44' S	70° 28' W	FCRAnA
	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FCRAnTI
<i>F. cumingi</i> Reeve, 1849	Los Verdes (Iquique)	20° 27' S	70° 12' W	FCUMnI
	Punta Arenas (Tocopilla)	21° 38' S	70° 09' W	FCUMnT
	Coloso (Antofagasta)	23° 44' S	70° 28' W	FCUMnA
	Isla Pan de Azúcar	26° 10' S	70° 40' W	FCUMnPA
	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FCUMnTI
	La Isla de Algarrobo	33° 21' S	71° 41' W	FCUMnAI
	Isla Cochino	41° 50' S	73° 49' W	FCUMnIC
	Polocue	41° 53' S	74° 02' W	FCUMnPC
<i>F. latimarginata</i> Sowerby, 1835	Los Verdes (Iquique)	20° 27' S	70° 12' W	FLATnI
	Punta Arenas (Tocopilla)	21° 38' S	70° 09' W	FLATnT
	Coloso (Antofagasta)	23° 44' S	70° 28' W	FLATnC
	Isla Pan de Azúcar	26° 10' S	70° 40' W	FLATnPA
	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FLATnTI
	La Isla de Algarrobo	33° 21' S	71° 41' W	FLATnAI
	Arco Cocholgue	36° 35' S	72° 58' W	FLATnTC
<i>F. limbata</i> Sowerby, 1835	Los Verdes (Iquique)	20° 27' S	70° 12' W	FLIMnI
	Coloso (Antofagasta)	23° 44' S	70° 28' W	FLIMnC
	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FLIMnTI
<i>F. maxima</i> Sowerby, 1835	Coloso (Antofagasta)	23° 44' S	70° 28' W	FMAXnA
	Tilgo	29° 31' S	71° 19' W	FMAXnTI
	La Isla de Algarrobo	33° 21' S	71° 41' W	FMAXnAI

<b><i>F. nigra</i></b> Lesson, 1831	Isla Kalau	49° 26' S	75° 30' W	FNIGnIK
<b><i>F. oriens</i></b> Sowerby, 1835	Calbuco Pargua	41° 46' S 41° 48' S	73° 30' W 73° 28' W	FORInCC FORInP
<b><i>F. peruviana</i></b> Lamarck, 1822	La Rinconada	23° 28' S	70° 30' W	FPERn
<b><i>F. picta</i></b> (Gmelin, 1791)	Los Bajos Punta Quillagua	33° 54' S 41° 35' S	71° 50' W 73° 48' W	FPICnPI FPICnPQ
<b><i>F. pulchra</i></b> Sowerby, 1835	Caleta Camarones Los Verdes (Iquique) Tilgo	19° 12' S 20° 27' S 29° 31' S	70° 17' W 70° 12' W 71° 19' W	FPULnCA FPULnI FPULnTI
<b><i>F. radiosa</i></b> Lesson, 1831	Isla Cochino	41° 50' S	73° 49' W	FRADnIC
<b><i>F. nimbosa</i></b> Linnaeus, 1758	Venezuela	11° 02' N	63° 53' W	FNIMn
<b><i>F. schrammii</i></b> Fischer, 1857	Cabo Verde	16° 05' N	22° 50' W	FSCHn FCVEn
<b><i>D. graeca</i></b> Linnaeus, 1758	Aguiño	42° 31' N	9° W	DGRAn
<b><i>H. tuberculata</i></b> Lamarck, 1822	Aguiño	42° 31' N	9° W	HTUBn

La identificación de los animales de Chile se realizó en base a las características morfológicas de valor taxonómico descritas por McLean (1984) y clave de identificación elaborada por Oliva y Castilla (1992), para especies del subgénero *Fissurella* (Tabla 9 y Tabla 10, y Anexo 2 respectivamente).

### III. Preservación de los ejemplares y toma de muestras

Para el proceso de preservación de los ejemplares obtenidos se utilizaron dos procedimientos. En el primero de ellos, las lapas fueron aletargadas completamente mediante frío (4 °C), posteriormente se les hizo una incisión longitudinal a lo largo del pie y fueron sumergidas en etanol de 96° en

una proporción de 1:5 (volumen animal: volumen etanol). En el otro, los animales fueron congelados y posteriormente sumergidos en etanol de 96°, en la proporción antes indicada. En ambos casos el alcohol fue cambiado a las 24 horas y a las 48 horas, para luego dejarlos en refrigeración a 4 °C, hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para este estudio se tomaron muestras de 4 a 20 ejemplares de las diferentes poblaciones de cada una de las especies de *Fissurella* y de un ejemplar de *Diodora graeca* y de *Haliotis tuberculata*, según el siguiente procedimiento: del pie de cada ejemplar se disectó una porción de aproximadamente 0,5 g de músculo, se colocó en un tubo Eppendorf y se cubrió con etanol de 96°. Estas muestras fueron mantenidas en frío (-20 °C), hasta el momento del aislamiento de ADN. Cada muestra fue rotulada con un código correspondiente a la especie (formado por 4 letras), seguido de un número correlativo (n) que identifica al animal y por la localidad (representada generalmente por letras), según se detalla en la Tabla 14.

#### **IV. Aislamiento del ADN total**

El aislamiento total del ADN se llevó a cabo a partir de 0,03 – 0,04 g del tejido preservado y siguiendo los protocolos descritos para el uso del DNeasy Tissue Kit (Qiagen) y NucPrep (Applied Biosystems), éste último en un equipo de aislamiento semiautomatizado ABI 6100 (Applied Biosystems). El primer protocolo consistió, básicamente, en la incubación del tejido, finamente picado, en un tampón de digestión que contiene un detergente y proteinasa K, a 55 °C durante 10 a 15 horas. Posteriormente, los restos no digeridos fueron precipitados mediante centrifugación, luego se colectó el sobrenadante y se desechó el precipitado. El ADN contenido en el sobrenadante fue precipitado con etanol y después de un lavado inicial este ADN fue adsorbido, en las condiciones adecuadas, a una resina contenida en

una columna específica, suplementada en ese kit. Este proceso permite una rápida purificación del ADN y su recuperación en solución tras el cambio de las condiciones iónicas, después de su desprendimiento de la resina por centrifugación. En el caso del segundo protocolo, el similar procesado de las muestras fue llevado a cabo en placas de 96 pocillos y mediante vacío. Finalmente, el ADN eluido, se almacenó a -20 °C, para ser usado en las distintas amplificaciones.

La integridad y el tamaño de los fragmentos de ADN extraídos, fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. Se hicieron registros fotográficos de los geles mediante el sistema de documentación de geles, del programa Quantity One (Bio RAD).

La concentración del ADN aislado se determinó mediante la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, y el grado de pureza respecto a proteínas se estableció por la relación de absorbancia entre 260/280 nm en espectrofotómetro Smart Spec<sup>TM</sup> (Labarca & Paigen, 1980). Las cuantificaciones se realizaron aproximadamente en un 10% de las muestras seleccionadas al azar.

## **V. Amplificación del ADN**

Mediante el método de PCR, reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.* 1988), se amplificaron los genes mitocondriales ARNr 16S, CYTB y ND1, y los nucleares H3, ITS1 e ITS2, usando como molde el ADN total aislado y cebadores específicos para cada uno de los genes mencionados.



### **V.1. Gen ribosomal 16S (ARNr 16S)**

Este gen mitocondrial es usado frecuentemente para elucidar relaciones filogenéticas a nivel de diferentes categorías taxonómicas, incluyendo intragenéricas de gastrópodos (Espoz *et al.* 2004; Schiaparelli *et al.* 2005).

Se amplificó un fragmento de la subunidad mayor del gen mitocondrial ARNr 16S usando el cebador 16SA (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y el cebador 16SA (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi *et al.* 1991). La amplificación se realizó en un volumen de 12,5 µl de una mezcla constituida por 1,25 µl de Buffer x 10 Promega; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM de cada uno de los dNTPs; 0,2 µM de cada cebador; 0,025 unidades de AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y de 20 a 75 ng de ADN aislado, y cantidad suficiente de agua esteril calidad mili-Q (agua purificada mediante sistema mili-Q) para completar el volumen de 12,5 µl. Algunas reacciones de amplificación se hicieron en un volumen de 15 µl, manteniéndose las concentraciones de los reactivos señalados anteriormente, usando la enzima Taq polimerasa (Promega).

La reacción se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 12 minutos seguida de 35 ciclos; cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización a 94 °C durante 20 segundos, fusión a 50 °C durante 20 segundos y extensión a 60 °C durante 60 segundos, y una etapa final de extensión a 60 °C por 5 minutos. En todas las ocasiones fue llevada a cabo simultáneamente una reacción de control negativo conteniendo sólo los reactivos, para verificar la ausencia de contaminación por ADN extraño.

## V.2. Gen citocromo b (CYTB)

Un fragmento del gen citocromo b fue amplificado mediante PCR con los cebadores UCYTB151F (5'-TGTGGRGCNACYGTWATYACTAA-3') y UCYTB272R (5'-GCRAANAGRAARTACCAYTC-3'), poseedores de sitios degenerados. Estos cebadores son adecuados para facilitar la amplificación de este segmento génico en una variedad de moluscos (Merritt *et al.* 1998). La reacción de PCR fue realizada mezclando 1,25 µl de Buffer x10 (Promega); 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM); 1,25 µl de dNTPs (10mM); 0,2 µl de cada cebador (20µM); 0,0625 µl (5 UI/µl) de *Taq* DNA polimerasa (Promega); 0,5 µl (40-100 ng) de DNA total y agua mili-Q recientemente esterilizada en autoclave en cantidad suficiente para completar un volumen final de 12,5 µl. Las reacciones que presentaron dificultades para amplificar el ADN se repitieron agregando BSA (9,86µg/µl) en volumen igual al Buffer x10. Si el resultado negativo persistía se incrementó la concentración de Mg<sup>+2</sup> a 3,5 µM. Estas modificaciones fueron suficientes para posibilitar la amplificación de este fragmento.

Las condiciones para la realización de las reacciones de PCR consistieron en una primera etapa de desnaturalización a 94 °C durante 3 min; seguida de 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 40 s, fusión a 50 °C durante 40 s y extensión a 72 °C durante 1 min y finalmente una extensión a 72 °C durante 7 min.

## V.3. Gen de la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1)

Recientemente se ha comprobado que este gen posee mutaciones suficientes para su utilización en estudios de análisis filogenéticos en especies de moluscos pertenecientes al mismo género (Quinteiro *et al.* 2005), pero debido a la carencia de cebadores universales, se requiere diseñar cebadores específicos.

### V.3.A. Diseño de cebadores específicos

La amplificación del segmento del gen ND1, se realizó mediante la utilización de cebadores específicos para *Fissurella*. Estos cebadores fueron diseñados a partir de alineamientos parciales de algunas especies representativas de *Fissurella*, obtenidos mediante amplificación con el par de cebadores 16SA - 16SB y el par MOL ND1F (5'-CGRAARGGMCCTAACAARGTTGG-3') - MOL ND1R: (5'-GGRGCACGATTWGTCTCNGCTA-3'). Estos alineamientos fueron complementados con las secuencias homólogas de otros moluscos disponibles en el GenBank y se analizaron las zonas nucleotídicas conservadas entre las especies que cumplieran con los requerimientos para el diseño de cebadores; entre otros, tener una longitud de 17 – 28 bases, cantidad de G más C igual al 50 - 60%, no tener complementariedad entre sí, temperatura de fusión entre 55 °C y 80 °C, definida por la relación  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$  °C (Innis & Gelfand, 1991). Estas zonas correspondieron con una situada en el gen del ARNt para Leucina (ARNt-Leu) y otra en la correspondiente al gen ND1. Los cebadores específicos diseñados fueron denominados FISS1-ND1F (5'-GGTGGCAGAATAAGTGCCTTAG-3') y FISS2-ND1R (5'-TACAGCCCGAATTGCCCC-3').

### V.3.B. Amplificación parcial del gen ND1

Mediante los cebadores diseñados se amplificó un fragmento que incluye secuencias correspondientes a los genes ARNt-Leu y ND1. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 15 µl con los siguientes reactivos y en la concentración final que se indica: Buffer Promega 1x; MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM; dNTPs 200 µM; cebadores 0,2 µM; Taq DNA polimerasa (Promega) 0,025 U; ADN total 40-150 ng. Las condiciones de PCR fueron una etapa de desnaturalización de 3 min a 94 °C, luego 35 ciclos

consistentes en desnaturalización a 94 °C durante 40 s, fusión a 50 °C durante 40 s y extensión durante 1,30 min a 72 °C. Finalmente, una etapa adicional de extensión durante 7 min a 72 °C. La reacción de control negativo se incorporó en cada ocasión.

#### **V.4. Gen histona H3 (H3)**

Se amplificó una porción de este gen mediante la utilización de los cebadores H3NF (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGAC-3') y H3NR (5'-ATRTCCTTGGGCATGATTGTTAC-3'), los cuales han sido empleados para elucidar la filogenia e historia evolucionaria de moluscos gasterópodos (Colgan *et al.* 2000).

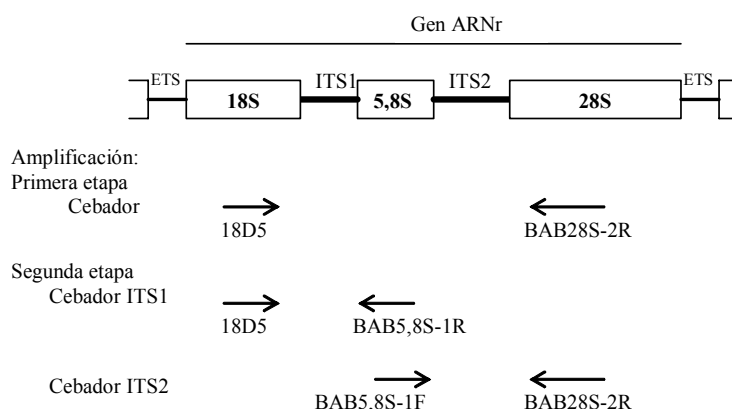
Las amplificaciones se hicieron mezclando Buffer Promega 10x (1,5 µl); MgCl<sub>2</sub> 25mM (1,5 µl); dNTPs 10 mM (1,2 µl); cebadores 20 µM (0,1 µl de cada uno); Taq polimerasa 5 U (Promega) 0,075 µl; ADN total 40-150 ng y 10,025 µl de agua mili-Q esterilizada en autoclave. Una reacción de control negativo fue incorporada en cada ocasión. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems), en las siguientes condiciones: una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min; una segunda etapa de 35 ciclos, consistentes en una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, fusión a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 40 s y una etapa final de extensión a 72 °C durante 7 min.

#### **V.5. Espaciadores ITS1 e ITS2**

Los espaciadores internos de transcripción ITS1 e ITS2 del gen nuclear ARNr, (ARN ribosómico), han sido empleados en reconstrucciones de filogenia de moluscos (Remigio & Blair, 1997; Quinteiro *et al.* 2005).

La amplificación de ITS1 e ITS2 se realizó por medio de la técnica de PCR anidada, consistente en dos etapas subsecuentes (Figura 11), cuyas características fueron las siguientes:

En la primera etapa se amplificó el segmento completo del gen ARNr usando el cebador 18D5 (5'-CACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTG-3') (Hillis *et al.* 1991) y el BAB28S-2R (5'-GACACTGAGGGATTTCGGTGC-3') (Quinteiro *et al.* 2005) y como molde el ADN aislado. Esta reacción de amplificación se hizo en un volumen total de 15 µl; mezclando BSA 9,86µg/µl (1,5 µl); Buffer 10x (1,5 µl); Cl<sub>2</sub>Mg (1,5 µl); dNTP (1,5 µl); Taq polimerasa Promega (0,0625 µl); 2 µl de cada cebador; 0,5 µl (40-150 ng) de ADN y 8,03 µl de agua mili-Q estéril. Las condiciones de PCR fueron desnaturalización inicial a 94° C durante 3 min, 35 ciclos con fase de desnaturalización a 94 °C, anillamiento a 50 °C y extensión a 72 °C durante 40 s, 40 s y 2,5 min respectivamente, seguido de una extensión final a 72 °C durante 7 min.



**Figura 11. Posiciones relativas de los cebadores para amplificar en la primera etapa el gen ARNr y en la segunda etapa los segmentos espaciadores internos ITS1 y el ITS2. (ETS: segmento espaciador externo, localizado entre genes ARNr).**

En la segunda etapa, se hicieron reacciones de reamplificación mediante el uso del cebador BAB5,8S-1R (5'-GCCGCCATATGCGTTCA-3') y el BAB5,8S-1F (5'-TGAACGCATATGGCGGC-3') (Quinteiro et al. 2005), de localización interna en los productos de PCR obtenidos, los cuales son usados como ADN moldes. Previamente, estos ADN moldes fueron sometidos a la acción de ExoSAP-IT (Amersham-Biosciences), que contiene las enzimas fosfatasa y exonucleasa, para degradar los cebadores e inactivar los dNTPs libres, remanentes de la reacción de PCR, para evitar su interferencia con las siguientes reacciones.

Se realizaron por separado reacciones para amplificar el segmento ITS1 con los cebadores 18D5 y BAB5,8S-1R y el segmento ITS2 con los cebadores BAB5,8S-1F y BAB28S-2R. En estas reacciones de reamplificación se utilizaron las mismas cantidades de los reactivos mencionados en la etapa 1. Sin embargo, no se usó BSA y se incrementó la cantidad de agua para completar el volumen final de 15 µl. Para obtener amplificaciones del ADN fue necesario diluir el producto de PCR molde entre 100 y 1.000 veces.

Las condiciones de reacción fueron desnaturalización inicial durante 3 min a 94 °C; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 s, fusión a 60 °C durante 40 s y extensión a 72 °C por 30 min, y una extensión final a 72 °C durante 7 min.

## **VI. Verificación de los productos de PCR**

La pureza y tamaño del producto final de las reacciones de PCR de cada amplificación se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,0% y 2,5% con tinción de bromuro de etidio y visualizado en transiluminador de luz ultravioleta. Se hicieron registros fotográficos de los geles mediante el sistema de documentación del programa Quantity One (BioRad). Todas las

reacciones que dieron un único producto génico, correspondiente al tamaño del gen o segmento amplificado, detectado mediante una banda simple con un rango de tinción de fuerte a mediana intensidad se almacenaron a -20 °C, para posterior secuenciación.

## **VII. Secuenciación de productos de PCR**

La secuenciación de los productos de PCR obtenidos, se realizó en tres etapas.

### **VII.1. Purificación de los productos de PCR**

Antes de la secuenciación los productos de PCR fueron purificados con las enzimas fosfatasa y exonucleasa, siguiendo el procedimiento descrito para el uso de ExoSAP-IT (Amersham-Biosciences); que permite digerir los cebadores y desactivar los dNTPs libres, que pueden interferir en la posterior reacción de secuenciación.

### **VII.2. Reacción de secuenciación**

La reacción de secuenciación se realizó por separado con cada uno de los dos cebadores empleados en la PCR de amplificación, permitiendo la secuenciación de cada hebra con la finalidad de minimizar errores. Para ello se mezclaron 3 – 4 µl (2,4 - 4,0 ng) del producto purificado de PCR, 1 µl de un cebador (3,2 pmoles) idéntico al usado en la reacción de amplificación de PCR, 1 µl de BigDye Terminator (v3.1), 1 µl Buffer de secuenciación, y agua mili-Q esterilizada, para completar un volumen final de 10 µl. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos

cada uno consistente en desnaturalización a 95 °C durante 15 s, fusión a 50 °C durante 15 s y extensión a 60 °C durante 4 min. Luego una etapa final de extensión a 60 °C durante 4 min.

### **VII.3. Electroforesis y detección de los productos de secuenciación**

Previo a la electroforesis, fue necesario eliminar el BigDye terminator para evitar la interferencia de las señales de los nucleótidos libres con la de los nucleótidos incorporados en los diferentes oligonucleótidos de secuenciación. Para la purificación, se utilizó una columna de gel DyeEx-96 (Qiagen) en la cual quedan retenidos los nucleótidos dejando pasar libremente los productos de extensión.

Los productos de extensión fluorescentes fueron separados mediante electroforesis y detectados empleando un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

### **VIII. Verificación de los electroferogramas**

Los electroferogramas extraídos desde el secuenciador, fueron analizados manualmente para verificar cualquier error en la lectura de los nucleótidos, utilizando el programa BioEdit 7.01 (Hall, 1999). Se contrastó cada electroferograma con el registro de su correspondiente secuencia, corrigiendo manualmente cada sitio de la secuencia que no quedó correctamente registrado y llevando a cabo la comparación entre hebras.

### **IX. Alineamiento de las secuencias**

Debido a la elevada homología entre secuencias, éstas fueron manualmente alineadas usando la herramienta disponible en el programa



BioEdit 7.01 (Hall, 1999). Posteriormente, este alineamiento múltiple de secuencias homólogas fue verificado mediante el programa Clustal, incluido en BioEdit o en el programa MEGA (Kumar *et al.* 1993). Fue necesario insertar sitios vacíos para alinear adecuadamente las secuencias de los segmentos del gen 16S y los del ITS1 e ITS2. Desde los extremos de cada alineamiento se excluyeron todos los nucleótidos correspondientes a los cebadores y los sitios vacíos o inciertos dejando todas las secuencias de igual longitud.

## **X. Caracterización de secuencias**

Las secuencias obtenidas se caracterizaron considerando los siguientes aspectos:

Homología de los segmentos génicos. Se realizó en base a la comparación con segmentos similares de la especie más emparentada filogenéticamente, considerando solamente las secuencias depositadas en el GenBank. Se estimó para cada gen secuenciado su posición relativa dentro del gen homólogo de la especie referente y también, para los segmentos con productos de transducción la cantidad de aminoácidos.

Análisis de posiciones nucleotídicas. Utilizando el programa DnaSP (Rozas *et al.* 2003) se estimaron el número de sitios vacíos, con inserciones, invariables y variables; y entre éstos, aquellos con información tipo parsimonia y singleton. Simultáneamente, se obtuvo el total de mutaciones, el número de haplotipos, diversidad nucleotídica y haplotípica.

Proporción de bases nitrogenadas. Se determinó, mediante PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002), el promedio porcentual de cada una de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que forman parte de cada gen y mediante la prueba de  $\chi^2$  se constató el grado de significancia de las variaciones interespecíficas en la proporción de las bases.

## XI. Inferencia filogenética

La reconstrucción de árboles filogenéticos se realizó, en una primera aproximación, en base a cada conjunto de secuencias obtenidas por cada gen independientemente. Tras la determinación de la posibilidad de combinación de determinados juegos de datos se procedió a la inferencia de las relaciones filogenéticas mediante su combinación para constituir un único conjunto de datos (evidencia total). La inferencia filogenética fue llevada a cabo mediante la utilización de metodologías basadas en análisis de distancias genéticas, parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

La reconstrucción de árboles se basa en el análisis, de forma independiente y combinada, de 100 secuencias mitocondriales del CYTB y ND1 y 32 del ARNr 16S, provenientes de los mismos organismos de cada especie de *Fissurella* e incorporando secuencias de *Diodora graeca* como grupo externo, para enraizar los árboles.

Entre las secuencias nucleares analizadas se incluyeron 14 secuencias combinadas de los espaciadores ITS1 e ITS2, y 19 pertenecientes a la Histona H3 (17 de *Fissurella*, 1 de *D. graeca* y 1 de *H. tuberculata*). Además, en la generación del árbol con secuencias del gen H3, fueron incorporadas secuencias homólogas obtenidas desde el GeneBank de especies de la familia Fissurellidae (*Fissurella virescens*, *Scutus unguis*, *Montfortula rugosa*, *Clypeosectus* sp., *Emarginula* sp., *Diodora cayenensis*, cuyos códigos de acceso son AY923946 – AY923951) y especies de Haliotidae: *Haliotis jacnensis*, *H. asinina*, *H. pustulata*, *H. virginea* y *H. tuberculata* con códigos AY923952 al AY923955 y AY377775, respectivamente.

### XI.1. Análisis de la congruencia de los juegos de datos

Mediante la aplicación del test de incongruencia de las diferencias de longitudes (ILD) de las secuencias (Farris *et al.* 1994) implementado en

PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002), se determinó qué conjuntos de secuencias correspondientes a cada gen podrían combinarse para el análisis filogenético. En concordancia con esta prueba se estructuraron los siguientes conjuntos (CYTB-ND1) con 100 secuencias; (CYTB-ND1-ARNr 16S) con 32 secuencias y (ITS1-ITS2), formado por 14 secuencias una por cada especie. El test se realizó mediante una búsqueda heurística con adición de taxones, algoritmo de intercambio de ramas TBR ("Tree Bisection Reconnection"), con 100 réplicas. Además se evaluó la señal filogenética en los conjuntos de datos simples y combinados, incluyendo una secuencia de cada taxón, mediante el estadístico -g1 (Hillis & Huelsenbeck, 1994).

## **XI.2. Análisis basados en el criterio de distancias genéticas**

Los árboles de filogenia molecular se construyeron mediante el programa MEGA (Kumar *et al.* 1993), basado en el modelo de distancias genéticas de Tamura-Nei y empleando el algoritmo de vecino más próximo ("Neighbor-Joining", NJ). Los niveles de fiabilidad de la topología del árbol se determinaron por la técnica de remuestreo ("bootstrapping") con 2000 réplicas. Los huecos del alineamiento fueron tratados con la opción de comparación entre pares de secuencias. Fueron usadas transiciones y transversiones del conjunto de los sitios codificantes y no codificantes. Se consideró la existencia de un patrón homogéneo de sustitución entre los distintos linajes y una tasa de sustitución uniforme entre los distintos sitios nucleotídicos.

Además, el análisis basado en distancia fue realizado mediante la selección del modelo evolutivo adecuado para el análisis de los juegos de secuencias mediante el programa ModelTest 3.6 (Posada & Crandall, 1998) y PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002). Se tuvieron en cuenta tanto los resultados obtenidos mediante la aplicación de criterio de Akaike como mediante el

análisis jerarquizado de los diversos modelos, basado en el test de relación de verosimilitudes (likelihood ratio test, hLRT) (Posada & Crandall, 1998).

Implementando el modelo evolutivo en PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002) se procedió a la obtención de la topología mediante NJ, obteniéndose el árbol consenso “majority-rule” manteniendo grupos con menores valores del 50% pero compatibles con el árbol. El número de replicaciones fue de 2000.

### **XI.3. Análisis basados en el criterio de parsimonia**

Los análisis de parsimonia (MP) de las secuencias mitocondriales fueron llevados a cabo con PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002).

Para cada juego de datos formando parte de juegos combinados (CYTB, ARNt-Leu, ND1, ARNr 16S, ITS1 e ITS2) se estimaron matrices de sustitución específicas de cada posición del codón, en las secuencias codificantes, y para los sitios de las secuencias no codificantes. Además, las sustituciones en dichas posiciones fueron compensadas de forma inversa y proporcional a su frecuencia. Así a la posición con mayor tasa de mutación, la tercera posición del codón en las secuencias codificantes, le fue asignado el menor peso (1); el resto de pesos mayores se asignó a las otras posiciones de forma proporcional.

En el caso de juegos mayores de 50 taxa, se aplicaron restricciones en la búsqueda de la topología. Así, fue fijada la topología dentro de los clados que agrupan a los diversos individuos de una misma especie y soportados con un nivel de 100% de valores de replicación en los análisis basados en el criterio de distancia. Ello implica una búsqueda más efectiva de las relaciones interespecíficas a nivel macroevolutivo, es decir, las de interés filogenético.

En el juego de datos con más de 50 taxa fue usada la búsqueda heurística, con 2000 replicaciones, siendo obtenido el árbol consenso

“majority-rule”, conservando aquellos grupos con valores menores de 50% compatibles con los otros grupos de dicho árbol.

El análisis de parsimonia de las secuencias combinadas ITS1 e ITS2 consideró el alineamiento de una secuencia por especie y precisando todos los polimorfismos alélicos, considerando aquellas posiciones vacías como un nuevo carácter y usando el algoritmo “branch and bound”. En este análisis, *F. nimbosea* fue usada como grupo externo. En todos los demás análisis el grupo externo utilizado fue la especie *D. graeca*.

#### **XI.4. Análisis basados en el criterio de verosimilitud**

Los análisis de máxima verosimilitud (ML) con los juegos combinados de secuencias mitocondriales fueron llevados a cabo con PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002).

De igual forma que en los análisis de distancias, fue usado el modelo evolutivo seleccionado por el programa ModelTest 3.6 (Posada & Crandall, 1998) y PAUP\* 4.0b10. Este modelo fue implementado en el archivo de entrada para PAUP\* 4.0b10, siendo efectuada una búsqueda heurística de la topología. Los árboles iniciales fueron obtenidos vía “stepwise addition”, manteniendo un único árbol en cada paso. El algoritmo usado para intercambiar las ramas fue mediante TBR, siendo colapsadas las ramas, originando una politomía, siempre que su longitud sea  $\leq 1e^{-8}$ .

#### **XI.5. Análisis mediante inferencia bayesiana.**

El análisis de las relaciones filogenéticas mediante inferencia bayesiana (Huelsenbeck *et al.* 2001) fue llevado a cabo mediante el programa MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y el conjunto de datos mitocondriales combinado. El modelo evolutivo incluyendo frecuencias de

bases, matriz de sustitución, parámetro  $\alpha$  de la distribución gamma de la tasa de variación y proporción de sitios invariables, fue específico de cada uno de los juegos de datos (CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S) permitiendo que cada partición evolucione con distintas tasas mutacionales. El número de generaciones fue de 200.000 con 2 ejecuciones simultáneas y 8 cadenas, representando 20.000 muestras de la distribución de probabilidades a posteriori.

## **XII. Análisis de polimorfismos de ADN amplificados al azar (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).**

Esta técnica se basa en la utilización de cebadores de cadena pequeña (10 pb) en una reacción de PCR, que permiten obtener marcadores polimórficos genómicos, los cuales han sido empleados para diversos fines como la identificación de especies y cepas, análisis de poblaciones, relaciones filogenéticas y taxonómicas (Almeida & Koelblinger, 2002).

Sin embargo, en este estudio, el análisis RAPD se ha realizado con fines comparativos que permitan verificar la congruencia entre los patrones observados a nivel mitocondrial y nuclear. Para ello, se verificará la presencia de perfiles polimórficos genómicos comunes en algunos clados monofiléticos, obtenidos con el ADN mt, entre las especies de *Fissurella*.

En este análisis RAPD, se utilizó solamente uno de los seis cebadores contenidos en el kit (RAPD Analysis Beads, Amersham Biosciences) el cual fue elegido después del análisis de reacciones previas que permitieron seleccionar el cebador que proporcionara el perfil polimórfico de mayor resolución entre especies. Estas reacciones se hicieron por separado para cada cebador, preparando mezclas que contenían 15  $\mu$ l de agua mili-Q estéril, una perla del kit (unidad liofilizada conteniendo ADN polimerasas, dNTPs, BSA y Buffer), 5  $\mu$ l de ADN (5ng/ $\mu$ l) molde y 5  $\mu$ l de un cebador (5 pm/ $\mu$ l).

La reacción de PCR consistió en una etapa previa de desnaturalización a 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos con fases de desnaturalización a 95 °C, de anillamiento y de extensión a 72 °C, durante 1 min, 1 min y 2 min respectivamente. Los fragmentos polimórficos resultantes de la reacción enzimática se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizados con luz U.V.

Se estableció que el patrón de segmentos polimórficos con suficiente resolución fue aquel obtenido con el cebador 4 (5'-GTAGACCCGT-3'). Los otros cebadores usados fueron los siguientes: 1 (5'-GGTGC GGGA); 2 (5'-GTTTCGCTCC); 3 (5'-GTAGACCCGT); 5 (5'-AACGCGCAAC-3') y 6 (5'-CCCGTCAGCA).

Posteriormente, con el cebador 4 se hicieron reacciones RAPDs para cada una de las especies de *Fissurella* de Chile y *F. nimbosa*, empleando por separado el ADN molde proveniente de dos animales por especie. Las mezclas de reacciones y las condiciones de amplificación mediante PCR fueron las mismas señaladas anteriormente.

Los fragmentos resultantes fueron visualizados en gel de agarosa mediante U. V. y se registraron en fotografía, mediante el sistema de documentación de geles proveído en el programa Quantity One (BioRAD). Mediante este programa se analizaron los perfiles cromatográficos en base al modelo de regresión punto a punto dado por la curva de absorción de U.V. del marcador. Se identificaron y agruparon los segmentos de tamaño similares, entre los distintos organismos, los cuales permitieron realizar la construcción de árboles filogenéticos por medio del método de distancia UMPGA, implementado en el mismo programa Quantity One.

### **XIII. Estructura genética poblacional**

Las secuencias mitocondriales, correspondientes al gen ND1 y sus haplotipos detectados, son usados para el estudio de genética poblacional detectando el grado de aislamiento y el nivel de flujo génico, que puede establecerse entre poblaciones separadas geográficamente (Brown *et al.* 2001).

#### **XIII.1. Especies seleccionadas**

Este análisis fue realizado en cuatro de las especies de *Fissurella* muestreadas. Dos de ellas, *F. latimarginata* y *F. cumingi*, se escogieron porque con ellas se abarcan los mayores rangos de distribución longitudinal, como se observa en la Tabla 14, comprendidos desde la Provincia Peruviana hasta el Área Intermedia para *F. latimarginata* y entre la Provincia Peruviana y el inicio de la Magallánica para *F. cumingi*. Además, el análisis intraespecífico permitirá evaluar con mayor fiabilidad el estatus taxonómico de especies diferenciadas, ya que ambas especies comparten los haplotipos más frecuentes y se agrupan en un clado polifilético.

Las otras dos especies seleccionadas fueron *F. crassa* y *F. limbata*, ambas con distribución en la Provincia Peruviana y que, además, fueron muestreadas en poblaciones localizadas en las mismas localidades costeras (Tabla 14).

#### **XIII.2. Aislamiento del ADN y secuenciación del gen ND1**

El ADN fue aislado a partir de aproximadamente 60 animales por especie, según el procedimiento descrito anteriormente mediante los reactivos NucPrep (AppliedBiosystems) en un equipo 6100 (AppliedBiosystems). A partir de este ADN se hicieron reacciones de PCR para amplificar el gen ND1, de acuerdo a lo mencionado en el punto V.3.B. Luego, se secuenció el



segmento y se alinearon las secuencias, en concordancia con el procedimiento descrito en el apartado VII del presente capítulo.

### **XIII.3. Análisis de la estructura genética poblacional**

Los datos acerca de la diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ), así como otros datos básicos acerca de las frecuencias de los haplotipos por población y los estadísticos de neutralidad, como Tajima's D, fueron estimados con Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.* 2005) y DnaSP (Rozas *et al.* 2003).

La relación entre los haplotipos fue evaluada mediante la elaboración de un esquema de red o “median joining network” con el programa Network (Bandelt *et al.* 1999). Los distintos haplotipos son conectados con vectores de longitud proporcionales a las diferencias nucleotídicas y recurriendo a vectores intermedios creados para representar haplotipos extintos o no muestreados.

A partir de los haplotipos detectados para la secuencia del gen ND1, se evaluó la heterogeneidad geográfica en la distribución de la frecuencia de los haplotipos mediante el programa REAP (McElroy *et al.* 1992).

La diferencia entre poblaciones y el nivel de significancia de divergencia entre ellas fue estimado a partir del clásico índice de fijación  $F_{ST}$ . Modificaciones de este índice para secuencias nucleotídicas, como  $N_{st}$  y los correspondientes  $N_m$ , indicador de los niveles de flujo génico, fueron también estimados mediante Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.* 2005) y DnaSP v. (Rozas *et al.* 2003).

Teniendo en cuenta la divergencia, esto es el número de mutaciones entre haplotipos, además de su frecuencia en cada población, se llevó a cabo el análisis de la varianza molecular (AMOVA) implementado en Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Agrupando las poblaciones, se definieron distintas estructuras poblacionales para evaluar. El análisis jerárquico de la varianza particiona la varianza en componentes de covarianza debidos a diferencias

entre los distintos niveles de estructuración. Así, la varianza molecular total es la suma del componente de la covarianza debido a diferencias entre haplotipos dentro de una población ( $\sigma^2_c$ ), a diferencias entre haplotipos de distintas poblaciones dentro de un grupo ( $\sigma^2_b$ ) y a diferencias entre grupos ( $\sigma^2_a$ ). La significancia de los respectivos índices de fijación,  $F_{ST}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{CT}$ , es evaluada usando una aproximación de permutación no paramétrica.

Basándose en la teoría de la coalescencia, fueron estimados diversos parámetros de la historia demográfica de las poblaciones a partir de la distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”). Se evaluó la coincidencia de dicha distribución con la esperada bajo un modelo de expansión demográfica o de rango geográfico súbita, mediante diversos test como SSD, Harpending’s Raggedness ( $H's R_i$ ), y los más sensibles, para la detección de un rápido crecimiento, como Fu’s  $F_s$  y  $R_2$ . Se determinaron los parámetros de expansión demográfica repentina tal como la datación del momento de la expansión ( $\tau$ ), el tamaño poblacional efectivo previo a la expansión ( $\theta_0$ ), y el tamaño con posterioridad al evento expansivo ( $\theta_1$ ).

#### **XIV. Metodología de autenticación de especies de *Fissurella* mediante PCR- RFLP**

La autenticación de las especies consideradas del género *Fissurella* se realizó mediante una combinación de la metodología de amplificación de un fragmento mitocondrial y posterior empleo de enzimas de restricción sobre los productos de PCR (PCR-RFLP: Polimerasa Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). El objetivo es que en cada especie se deberían producir fragmentos de restricción característicos con diferentes tamaños, dando lugar a patrones de restricción específicos.

El programa BioEdit versión 7.01 (Hall, 1999) fue utilizado para analizar las secuencias obtenidas para distintos segmentos de genes de

*Fissurella* con la finalidad de detectar los sitios polimórficos existentes para las enzimas de restricción. Se seleccionaron las secuencias obtenidas con los cebadores UCYTB 151F y UCYTB 272R (Merritt *et al.* 1998) correspondientes al citocromo b y las enzimas *Nla* III (CATG') y *Hpy*CH4 V (TG'CA) (isosquizómero: *Cvi*RI) (NEB).

El protocolo desarrollado consta de las siguientes etapas:

Etapa 1. Extracción de ADN según procedimiento descrito en apartados anteriores.

Etapa 2. Amplificación del segmento del gen UCYTB. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 30 µl conteniendo Buffer Promega x 10; Cl<sub>2</sub>Mg 2,5 mM; dNTP 200 µM de cada uno; 0,1 µM de cada cebador; 0,025 U/I de Taq DNA polimerasa (Promega) y 1,0 µl (50 ng/µl) de ADN total. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C, fusión a 50 °C y extensión a 72 °C durante 20 s, 30 s y 60 s, respectivamente; más una extensión final a 72 °C durante 5 min. El producto fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio, visualizado con luz ultravioleta.

Etapa 3. Reacción con enzimas de restricción.

El producto de PCR fue digerido por separado con 5 unidades de las enzimas *Nla* III (CATG') y *Hpy*CH4 V (TG'CA), durante 4 h a 37 °C, en un volumen total de 20 µl.

Los fragmentos de la digestión se visualizaron en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en transiluminador de luz ultravioleta y se obtuvieron fotografías digitalizadas empleando el programa Quantity One.



## RESULTADOS

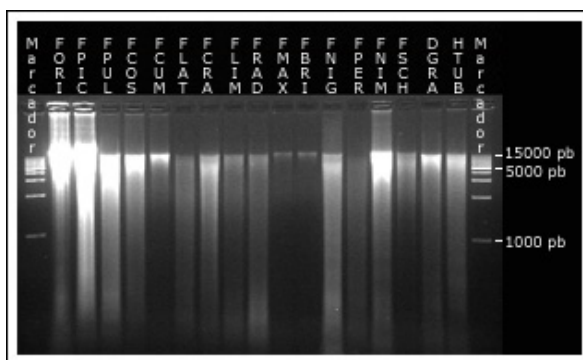




## I. Calidad y pureza del ADN total aislado

El ADN total que se aisló del músculo del pie de los animales, estuvo compuesto por fragmentos de tamaños variables, como se puede apreciar en la Figura 12, distinguiéndose una banda de alto peso molecular ( $> 15$  Kpb) y una mezcla de fragmentos de menor tamaño, incluyendo fragmentos  $< 1$  Kpb. Esta desigualdad de tamaño es producto de la degradación del ADN por la actividad de las endonucleasas del tejido. Estas enzimas, probablemente se activaron desde que las lapas fueron sacadas de su medio y su actividad degradativa sobre el ADN la ejercieron hasta que fueron inactivadas por la acción desnaturalizante del etanol, o por efecto de la baja temperatura a la que fueron sometidos los animales.

La cantidad de ADN aislado no fue similar en todos los especímenes, fluctuando entre los 75 y 300 ng/ $\mu$ L. El ADN aislado resultó de una pureza estimada en 1,45 a 1,84; los cuales están dentro del rango mínimo y óptimo de pureza para aislamiento de ADN desde tejidos, según el método de aproximación basado en la relación de absorbancia A260/A280 nm.

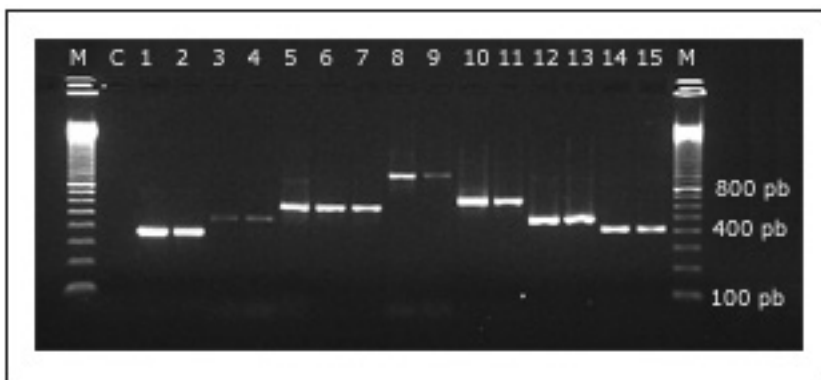


**Figura 12.** Gel de agarosa, mostrando la variabilidad de tamaño de los segmentos de ADN aislado de diferentes especies. Código de especies según lo indicado en Tabla 14.

## II. Amplificación de genes

Aunque el ADN aislado presentó una gran heterogeneidad de tamaño y degradación, los segmentos génicos a amplificar estaban intactos en cantidades mínimas suficientes para facilitar su amplificación. Además, el éxito de la amplificación de los genes resultó favorecido por el grado de pureza del ADN y la ausencia de factores inhibidores de la PCR en las muestras de ADN molde.

En la Figura 13 se muestra un gel de agarosa representativo de algunos de los patrones típicos del tamaño e intensidad de las bandas correspondientes a los productos de PCR generados.

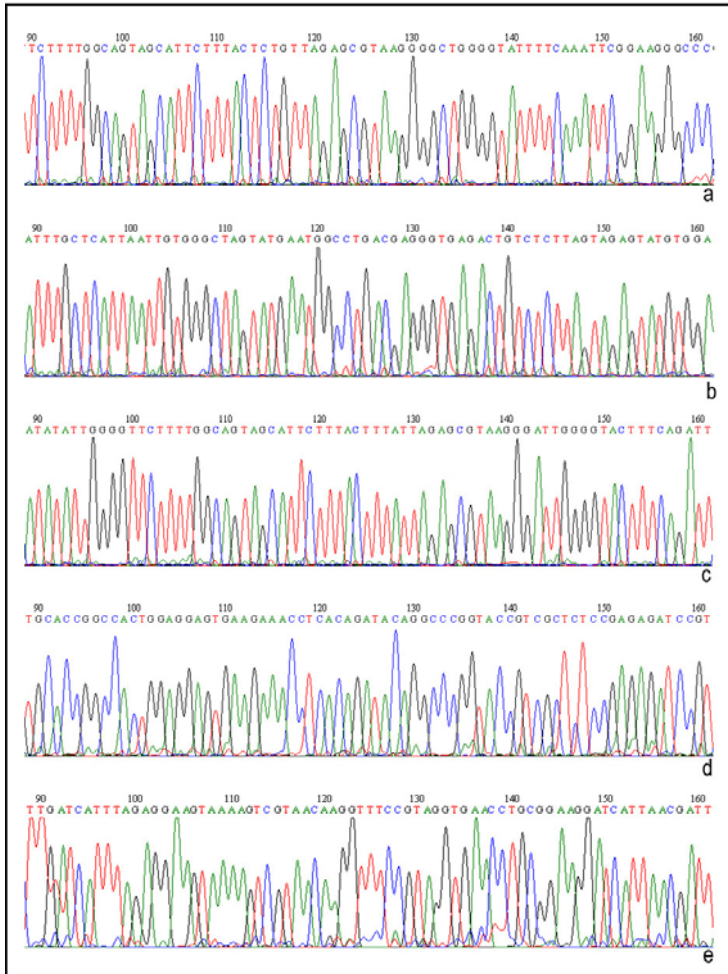


**Figura 13.** Muestra representativa de los diferentes genes amplificados mediante PCR y el tamaño de los segmentos en comparación al marcador (M). C: Control negativo; 1-2: CYTB; 3-4: ND1; 5-7: ARNr 16S; 8-9: ARNr 18S+ITS1+ARNr 5.8S+ITS2+ARNr 28S; 10-11 ITS1; 12-13: ITS2; 14-15: histona H3.



### III. Secuenciación

La metodología de secuenciación utilizada, pone en evidencia que la selección de los cebadores seleccionados fueron los adecuados para conseguir una amplificación exitosa de los genes mitocondriales y nucleares, elegidos para realizar el presente estudio en lapas.



**Figura 14** Segmentos de electroferogramas obtenidos de la secuenciación de los siguientes genes: a: CYTB; b: ARNr 16S; c: ARNr-Leu - ND1; d: H3; e: ITS2.

La obtención de electroferogramas con alto poder de resolución permitió establecer adecuadamente la secuencia de nucleótidos para cada uno de los segmentos de los genes analizados. En la Figura 14, se destacan los segmentos de electroferogramas que definen la secuencia de los nucleótidos de varios amplicones.

#### **IV. Caracterización de secuencias**

Para cada una de las especies consideradas en este estudio, se verificó la homología de los distintos genes mitocondriales amplificados y secuenciados con los genes descritos para *Haliotis rubra*, única especie del grupo Fissurelloidea cuyo genoma mitocondrial completo es conocido (Nº de acceso: AY588938). Además, se determinó la posición relativa de los genes de *Fissurella* respecto al genoma mitocondrial de *H. rubra*.

##### **IV.1. Segmento del gen citocromo b (CYTB)**

En *Haliotis rubra* el gen CYTB, tiene una extensión de 1140 pares de bases (pb), estando ubicado desde el nucleótido 10481 al 11620. En este estudio, el cebador UCYTB272R (5'-GCRAANAGRAARTACCAATC-3'), se unió complementariamente con los nucleótidos comprendidos entre la posición 10788 a 10807 del genoma mitocondrial de *H. rubra* y el cebador UCYTB151F (5'-TGTGGRGCNACYGTWATYACTAA-3') entre las posiciones 11175 y 11197.

En correspondencia con los límites determinados por los cebadores se amplificó un segmento de 410 pb, incluidos los cebadores del gen CYTB, para todas las especies del género *Fissurella* y *Diodora graeca*. Después de la secuenciación de los segmentos se obtuvo un alineamiento final de un

segmento de 348 nucleótidos que, aproximadamente, se corresponde con el segundo tercio del gen CYTB.

Se alinearon 100 secuencias homólogas del segmento del gen CYTB, de las cuales una corresponde a *D. graeca*, 9 a *Fissurella* del Atlántico (3 del Caribe y 6 de la costa africana del Atlántico Oriental) y 90 a las 13 especies del subgénero *Fissurella* del Pacífico Sudoriental. Estas secuencias fueron enviadas al Genbank y están disponibles con los códigos de acceso: AY 940884 al AY 940977.

La traducción de cada secuencia de 348 pb, entre los cuales no existen inserciones ni deleciones, resulta en un fragmento de 116 aminoácidos, de los 375 mencionados para la proteína CYTB de *H. rubra* (Nº de Acceso: AY588938).

Las secuencias, de las especies de la costa templada del Pacífico Sudoriental, presentan 247 sitios invariables (71%) y 101 sitios variables (29%), destacando entre estos últimos 10 sitios tipo singleton y 91 con contenido informativo para parsimonia. Se distinguen 101 mutaciones y 48 haplotipos, con una diversidad nucleotídica de  $0,0793 \pm 0,0045$ . La composición promedio porcentual de los nucleótidos pone en evidencia la mayor contribución de T en este segmento génico. Las frecuencias de las bases fueron: T (37,5%), G (23,6%), A (20,6%) y C (18,3%), siendo  $G + C = 41,9 \%$ ; las cuales son homogéneas entre las diferentes especies ( $\chi^2 = 22,81$ ; g.l.=75;  $P=1.0$ ).

#### **IV.2. Segmento del gen ARNr 16S**

En el abalón, *Haliotis rubra*, el gen que codifica para la subunidad ARNr 16S, se localiza entre el sitio 13404 y 14894, lo que le confiere una extensión de 1491 pb.

Los cebadores 16SA (5'-CGCCTGTTTATCAAAAAC-3') y el 16SB (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') establecieron uniones complementarias con los sitios 14097-14113 y 13540-13561, respectivamente. Consecuentemente, desde el ADN extraído de cada uno de los animales, se amplificó un segmento genómico de 574 pb, incluyendo ambos cebadores. De este segmento se logró el alineamiento de 480 pb, localizado en la primera mitad del gen ARNr 16S.

Se elaboró un conjunto de 32 secuencias, una proveniente de un espécimen de *D. graeca* y las otras 31 de 15 especies de *Fissurella*.

Las secuencias alineadas, presentan un tamaño de 487 pb, incluyendo 14 sitios con inserciones-delecciones. Entre especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, las secuencias presentan 9 sitios con huecos de alineamiento, 454 sitios conservados y 24 variables; de los cuales 22 sitios corresponden al tipo informativo para parsimonia y 2 al de singleton. Se registran un total de 27 mutaciones y 14 haplotipos diferentes, resultando en una diversidad nucleotídica igual a  $0,0165 \pm 0,0012$ .

El promedio de frecuencia de bases que constituyen este segmento corresponde a un 29,5% para T; 28,1% a A; 27,1% de G y 15,3% a C, y en consecuencia la sumatoria de G con C equivale al 42,4%. El test de homogeneidad de bases indica que las diferencias no son significativas ( $\chi^2=6,13$ ; g.l.=48;  $P=1,0$ ).

#### **IV.3. Segmento del gen ARNt-Leu y ND1**

Los cebadores específicos diseñados para amplificar el gen ND1 de *Fissurella*, permitieron amplificar el 40% de la primera mitad del gen ND1 y un tercio del gen ARNt-Leu, en comparación con segmentos homólogos de *H. rubra*.

Concretamente, en *H. rubra* el gen ND1 se encuentra localizado entre el sitio 12333 y el 13180 y el ARNt-Leu entre 13178 a 13245 y los cebadores utilizados FISS1-ND1F (5'-GGTGGCAGAATAAGTGCGTTAG-3') y el FISS2-ND1R (5'-TACAGCCCCGAATTGCCCC-3') son complementarios a los sitios 13220-13241 y 12764-12781 de ND1 y ARNt-Leu, respectivamente. La hibridación específica de estos cebadores con el ADN molde de *Fissurella* permitió amplificar un segmento de 478 pb, incluyendo los correspondientes cebadores. Desde este segmento amplificado se alinearon 425 pb, de los cuales los primeros 21 pb corresponden al ARNt-Leu y los restantes al segmento del gen ND1.

Se estableció un conjunto de secuencias pertenecientes a 99 organismos de 15 especies de *Fissurella* y una al grupo externo *D. graeca*. La secuencia posee 423 pb y carece de sitios vacíos y de inserciones. Los 21 pb iniciales no son codificantes y corresponden al ARNt-Leu. Los restantes codifican para el gen ND1 y la transducción de ellos resulta en un fragmento polipeptídico de 104 aminoácidos, de los 315 mencionados para esta enzima en *H. rubra* (Genbank: AY 588938), participante en el transporte de electrones en la cadena respiratoria. Las secuencias establecidas para *Fissurella* y *D. graeca*, han sido depositadas en el Genbank y tienen código de acceso desde AY040977 al AY941071.

En las secuencias se detectaron 211 (74%) sitios invariables y 109 (26%) sitios variables; de estos últimos 101 corresponden al tipo informativo parsimonioso y 8 al de singleton. Las mutaciones favorecen la configuración de 49 haplotipos, poseedores de una diversidad haplotípica de  $0,952 \pm 0,014$  y diversidad nucleotídica igual a  $0,0728 \pm 0,0039$ .

Entre las bases que forman la secuencia, T es la mayoritaria con una frecuencia promedio de 39,3%, seguida de G (26%), A (19,6%) y C (15,1%). Estas variaciones porcentuales de las frecuencias no son suficientes para

producir modificaciones significativas de la homogeneidad de las bases, según lo estimado por la prueba de  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 26,02$ ; g.l.= 69;  $P = 1,0$ ).

#### IV.4. Segmento del gen nuclear histona H3 (H3)

Se amplificó un segmento de 377 pb, incluyendo los nucleótidos de los cebadores H3NF (5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGAC-3') y H3NR (5'-ATRTCCTTGGGCATGATTGTTAC-3'). De este segmento se obtuvo un alineamiento de 314 pb, que es homólogo con los segmentos del gen H3 descrito para otras especies de la Familia Fissurelloidae (por ej.: *Fissurella virescens*, AY 923946 y *Diodora cayenensis*, AY 923951).

En este estudio, la secuencia del fragmento del gen H3 está compuesta por 314 pb. Entre las secuencias obtenidas de las trece especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental se ha detectado un único haplotipo, debido a la ausencia de sitios con mutaciones y a la inexistencia de delecciones e inserciones. Sin embargo, las secuencias de especies de *Fissurella* del Pacífico muestran diferencias del orden de 23 mutaciones con las especies de *Fissurella* que habitan en la costa del Atlántico.

La composición de bases de gen H3 en *Fissurella* de la costa de Chile se caracterizó por la mayor cantidad porcentual de T (29,9%); seguida por G (26,4%), A (23,6%) y finalmente T (20,1%).

#### IV.5. Secuencias nucleares de los interespaciadores ITS1-ITS2

La secuenciación de los diversos productos de PCR conteniendo secuencias de los interespaciadores ribosomales, ITS1 e ITS2, permitieron obtener un alineamiento de 323 pb y 293 pb de largo, respectivamente.

La longitud de estas secuencias para cada especie varía desde 278 hasta 314, y desde 273 a 282 para ITS1 e ITS2, respectivamente. En ambas

secuencias los polimorfismos de longitud son más frecuentes en *F. crassa* y *F. nimbosea*, destacando una inserción común mayor de 10 pb en el ITS1. Los valores medios de divergencia genética son idénticos para las dos secuencias (ITS1:  $0,051 \pm 0,006$ ; ITS2:  $0,050 \pm 0,006$ ). Debido a la ausencia de paso intermedio de clonación de los productos de PCR, se detectaron sitios polimórficos en los electroferogramas, como resultado de la amplificación y secuenciación de varios alelos simultáneamente.

## **V. Inferencia de las relaciones filogenéticas en el género *Fissurella***

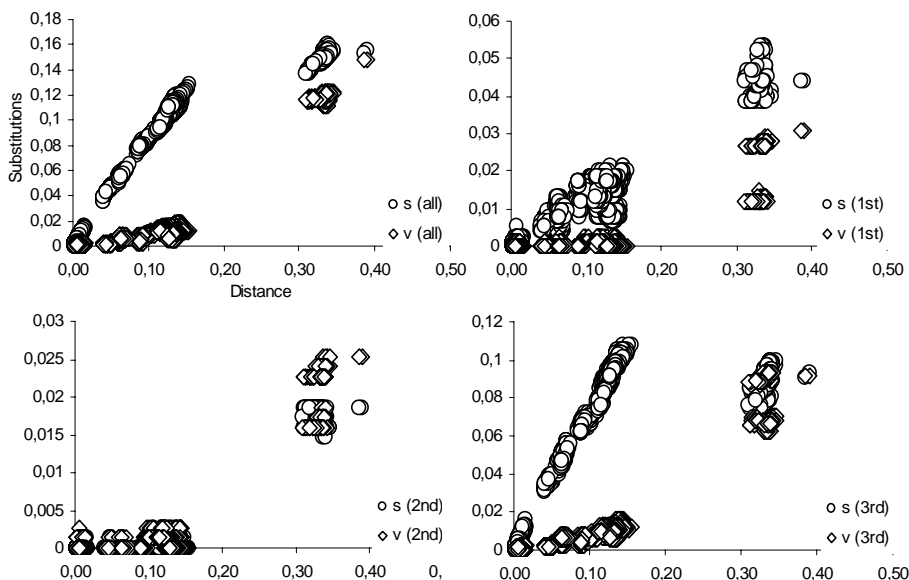
La reconstrucción de las relaciones filogenéticas han sido realizadas, en una primera aproximación, para cada una de las secuencias obtenidas mediante el criterio de distancias. Las topologías obtenidas permitieron observar las zonas robustas y aquellas inestables del árbol filogenético. Estos resultados iniciales han conllevado la adición de nuevos juegos de datos, para incrementar la señal filogenética y la evaluación de metodologías de inferencia alternativas.

### **V.1. Dinámica mutacional**

#### **V.1.A. Evaluación de los niveles de saturación.**

La evaluación de forma gráfica de los niveles de saturación en las secuencias codificantes, correspondientes a los genes mitocondriales CYTB y ND1, permite observar como en cualquiera de las posiciones el número de transiciones supera a las transversiones, en especial en la tercera posición, donde el número de mutaciones es mayor. Sin embargo la relación es menor para los mayores valores de distancia, donde en la tercera posición del codón llegan a superponerse. Esta situación corresponde a las comparaciones entre los

clados más divergentes de *Fissurella*, Atlántico y Pacífico, y al grupo externo con el resto de especies del género *Fissurella* (Figura 15).



**Figura 15. Relación entre la distancia genética y el número de transiciones y transversiones para los genes mitocondriales codificantes CYTB y ND1. Se evalúan por separado el total de posiciones y las mutaciones en la primera, segunda y tercera posición del codón.**

### V.1.B. Divergencia genética.

El valor promedio de distancias genéticas (p-distancia) en las secuencias codificantes mitocondriales de los genes CYTB ( $0,109 \pm 0,009$ ) y ND1 ( $0,106 \pm 0,008$ ) son similares. A nivel intraespecífico también existe una correlación entre las distancias estimadas en base a estos dos genes, variando desde valores de 0 a 0,015. En el gen CYTB el mayor valor intraespecífico es



obtenido en la especie *F. costata* (0,015), mientras que en el gen ND1, este valor se obtiene en *F. nigra* (0,012). En ambos casos, los valores mínimos se obtienen entre las especies *F. latimarginata* y *F. cumingi* (0) e incluyendo a *F. bridgesii* y *F. oriens*. Los valores de divergencia medios son de 0,5% y 0,4% estimados a partir del gen CYTB y ND1, respectivamente.

En el alineamiento del CYTB, la divergencia media entre las especies atlánticas se sitúa en un 23,2%. La divergencia entre la especie del Atlántico Occidental y las especies del Pacífico Sudoriental es de 25,1%, con un valor máximo de 26,8% y mínimo de 23,1%. Entre las especies del Pacífico el valor medio es de 8,9%, con un máximo de 14,1% (Tabla 15).

**Tabla 15. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del citocromo b para las especies analizadas del género *Fissurella*. Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>F. schrammii</i>		0,021	0,022	0,023	0,022	0,022	0,023	0,022	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
<i>F. nimbose</i>	0,232		0,022	0,021	0,022	0,021	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,023	0,022	0,023
<i>F. limbata</i>	0,250	0,237		0,012	0,016	0,012	0,013	0,010	0,017	0,016	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
<i>F. picta</i>	0,257	0,235	0,055		0,016	0,001	0,014	0,012	0,016	0,015	0,016	0,016	0,017	0,016	0,016
<i>F. peruviana</i>	0,233	0,238	0,107	0,114		0,016	0,016	0,015	0,018	0,015	0,016	0,016	0,017	0,016	0,017
<i>F. costata</i>	0,252	0,231	0,054	0,002	0,110		0,013	0,012	0,016	0,015	0,016	0,016	0,017	0,016	0,016
<i>F. nigra</i>	0,263	0,244	0,074	0,082	0,111	0,074		0,014	0,017	0,016	0,017	0,016	0,016	0,016	0,016
<i>F. maxima</i>	0,245	0,242	0,042	0,060	0,102	0,056	0,086		0,017	0,015	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
<i>F. crassa</i>	0,265	0,253	0,131	0,130	0,141	0,126	0,130	0,129		0,017	0,017	0,017	0,017	0,016	0,017
<i>F. radiosa</i>	0,251	0,255	0,095	0,098	0,096	0,094	0,106	0,095	0,114		0,010	0,011	0,011	0,011	0,011
<i>F. pulchra</i>	0,256	0,260	0,116	0,120	0,104	0,116	0,114	0,106	0,117	0,046		0,009	0,009	0,009	0,009
<i>F. oriens</i>	0,244	0,263	0,112	0,116	0,112	0,113	0,097	0,110	0,110	0,050	0,034		0,005	0,003	0,004
<i>F. bridgesii</i>	0,253	0,268	0,111	0,124	0,115	0,119	0,103	0,115	0,114	0,050	0,034	0,010		0,002	0,003
<i>F. cumingi</i>	0,250	0,265	0,112	0,119	0,111	0,115	0,100	0,110	0,111	0,047	0,033	0,005	0,005		0,000
<i>F. latimarginata</i>	0,252	0,266	0,114	0,120	0,113	0,117	0,103	0,111	0,114	0,049	0,034	0,008	0,005	0,000	

Para las secuencias del gen mitocondrial ND1, los valores obtenidos son similares a los estimados para el CYTB. Así, la divergencia media entre *F. nimbose* y las especies del Pacífico Sudoriental es de 27,7%, (max.:29,6%, min.:25,8%). Dentro del grupo de especies con distribución en el Pacífico Sudoriental el valor medio se sitúa en 8,5%, con un valor máximo de 14,2% (Tabla 16).

**Tabla 16. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del ND1 para las especies analizadas del género *Fissurella*. Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>F. schrammii</i>		0,021	0,020	0,021	0,020	0,020	0,022	0,021	0,020	0,021	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
<i>F. nimbosa</i>	0,233		0,022	0,022	0,022	0,022	0,021	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022	0,022
<i>F. limbata</i>	0,263	0,295		0,011	0,015	0,010	0,013	0,008	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
<i>F. picta</i>	0,266	<b>0,296</b>	0,061		0,017	0,000	0,013	0,010	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
<i>F. peruviana</i>	0,245	0,275	0,115	0,142		0,017	0,015	0,016	0,015	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
<i>F. costata</i>	0,265	0,292	0,058	0,000	0,141		0,013	0,010	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
<i>F. nigra</i>	0,260	<b>0,258</b>	0,082	0,081	0,115	0,080		0,012	0,013	0,014	0,014	0,015	0,015	0,014	0,015
<i>F. maxima</i>	0,261	0,288	0,033	0,052	0,128	0,051	0,072		0,014	0,015	0,015	0,014	0,014	0,014	0,014
<i>F. crassa</i>	0,232	0,259	0,109	0,117	0,103	0,116	0,092	0,103		0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
<i>F. radiosa</i>	0,232	0,269	0,103	0,111	0,074	0,110	0,093	0,116	0,097		0,008	0,011	0,011	0,011	0,011
<i>F. pulchra</i>	0,237	0,276	0,103	0,114	0,074	0,112	0,104	0,111	0,102	0,027		0,010	0,010	0,010	0,010
<i>F. oriens</i>	0,245	0,272	0,098	0,120	0,073	0,118	0,118	0,106	0,096	0,056	0,051		0,003	0,002	0,002
<i>F. bridgesi</i>	0,249	0,274	0,103	0,125	0,070	0,123	0,117	0,107	0,093	0,057	0,053	0,004		0,001	0,001
<i>F. cumingi</i>	0,246	0,271	0,098	0,121	0,069	0,119	0,115	0,103	0,092	0,055	0,050	0,002	0,001		0,000
<i>F. latimarginata</i>	0,249	0,274	0,101	0,124	0,069	0,121	0,116	0,105	0,093	0,057	0,052	0,003	0,001	0,000	

En el alineamiento del gen ARNr 16S, más conservado que los anteriores, los valores obtenidos son inferiores a los estimados con anterioridad. Así el valor máximo de divergencia de *F. nimbosa*, respecto de las especies del Pacífico Sudoriental es de 18,6%. El valor máximo de divergencia entre las últimas especies es de tan sólo un 3,4% (Tabla 17).

**Tabla 17. Matriz de distancias –p netas interespecíficas obtenidas a partir de secuencias del ARNr 16S para las especies analizadas del género *Fissurella*. Por encima de la diagonal se muestran los valores de E.S. (Error Standard), estimados mediante 500 replicaciones.**

	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	6,000	7,000	8,000	9,000	10,000	11,000	12,000	13,000	14,000	15,000
<i>F. schrammii</i>		0,016	0,015	0,016	0,016	0,015	0,016	0,016	0,016	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,016
<i>F. nimbosa</i>	0,150		0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,017	0,017	0,017	0,017	0,016
<i>F. limbata</i>	0,162	0,175		0,005	0,005	0,005	0,007	0,006	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
<i>F. picta</i>	0,167	<b>0,171</b>	0,013		0,000	0,004	0,007	0,006	0,004	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008
<i>F. costata</i>	0,167	<b>0,171</b>	0,013	0,000		0,004	0,007	0,006	0,004	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,008
<i>F. nigra</i>	0,165	0,173	0,011	0,011	0,011		0,007	0,006	0,004	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006
<i>F. peruviana</i>	0,169	0,177	0,027	0,025	0,025	0,027		0,006	0,008	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
<i>F. radiosa</i>	0,162	0,181	0,019	0,019	0,019	0,017	0,019		0,006	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006
<i>F. maxima</i>	0,169	0,175	0,011	0,011	0,011	0,008	<b>0,034</b>	0,021		0,007	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007
<i>F. pulchra</i>	0,162	0,182	0,021	0,021	0,021	0,019	0,019	0,004	0,023		0,003	0,003	0,003	0,003	0,006
<i>F. oriens</i>	0,165	0,186	0,021	0,021	0,021	0,019	0,021	0,006	0,019	0,004		0,000	0,000	0,000	0,006
<i>F. bridgesi</i>	0,165	0,186	0,021	0,021	0,021	0,019	0,021	0,006	0,019	0,004	0,000		0,000	0,000	0,006
<i>F. cumingi</i>	0,162	0,184	0,021	0,021	0,021	0,019	0,021	0,006	0,019	0,004	0,000	0,000		0,000	0,006
<i>F. latimarginata</i>	0,165	0,186	0,021	0,021	0,021	0,019	0,021	0,006	0,019	0,004	0,000	0,000	0,000		0,005
<i>F. crassa</i>	0,167	0,186	0,027	0,032	0,032	0,021	0,025	0,015	0,024	0,015	0,017	0,017	0,017	0,016	

## **V.2. Filogenia molecular basada en secuencias parciales del gen citocromo b**

En la reconstrucción de la filogenia basada en este segmento, se observan un primer clado divergente conteniendo las especies de *Fissurella* del Atlántico, en el que *F. nimbosa* y *F. schrammii* aparecen como especies hermanas y cada una de ellas formando una unidad monofilética y un segundo clado constituido por las especies del Pacífico Sudoriental, dentro del cual hay algunas relaciones que no se pueden resolver, generándose una relación en politomía a nivel basal, producida por el colapso de los nodos que registraron un valor de soporte de replicación inferior al 50% (Figura 16).

La politomía basal implica a cuatro clados, incluyendo el grupo I de especies, compuesto por *F. cumingi*, *F. latimarginata*, *F. bridgesii*, *F. oriens*, *F. radiosa*, *F. pulchra* y *F. crassa*; el grupo II de especies formado por *F. costata*, *F. picta*, *F. limbata*, *F. maxima* y los clados de las especies *F. peruviana* y *F. nigra*.

En el grupo I (valor de replicación: 96%) se distingue el complejo de especies denominado “complejo latimarginata”, integrado por especies morfológicamente identificadas bajo las denominaciones *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*, cuyos individuos representantes no se agrupan monofiléticamente en congruencia con los morfotipos correspondientes a cada especie citada. Además se distinguen tres agrupaciones monofiléticas independientes, formadas por la especies *F. pulchra*, *F. radiosa*, y *F. crassa*, con elevados valores de replicación (>89%), siendo esta última la que ocupa la posición basal del grupo I. Como clado hermano del “complejo latimarginata” se ubica *F. pulchra*. Sin embargo el soporte del grupo I no es elevado (66%).

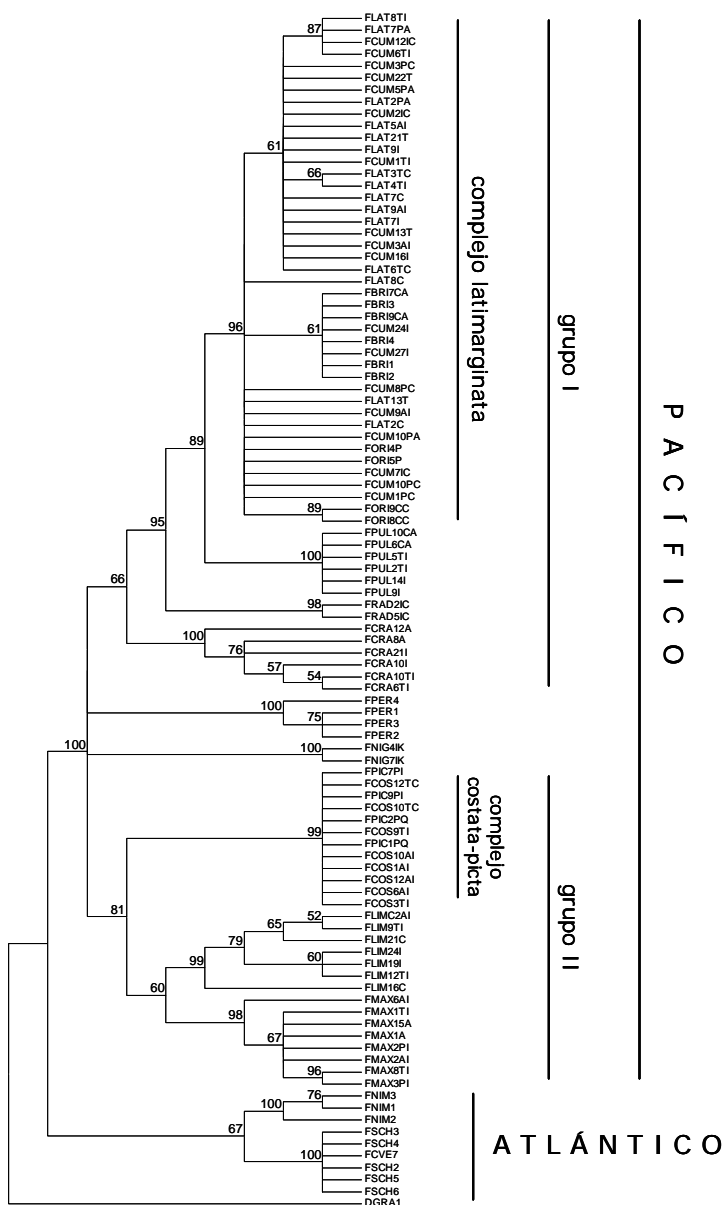


Figura 16. Árbol filogenético del subgénero *Fissurella* de Chile, obtenido con secuencias parciales del citocromo b. Modelo de distancia de Tamura-Nei y método de Neighbor-Joining. Para enraizar el árbol se usó *D. graeca* (DGRA1). En los nodos se indican valores de replicación (x2000) superiores al 50% y se han colapsado los inferiores.

En el grupo II, con un valor de soporte del 81%, también se distingue un complejo de especies, con alto valor de replicación (99%), formado por individuos asignados a *F. costata* y *F. picta*, y cuya determinación taxonómica específica ha sido establecida en base a caracteres morfológicos. Este “complejo costata–picta”, aparece como hermano del grupo formado por *F. limbata* y *F. maxima*. Estas últimas especies son hermanas entre sí, formando cada una unidades monofiléticas (Figura 16).

En lo sucesivo se entenderá por grupo de especies I el clado que contenga al “complejo latimarginata”, mientras que el grupo II contendrá al “complejo costata-picta”.

### **V.3. Filogenia molecular basada en secuencias parciales de los genes ARNt-Leu y ND1**

El árbol elaborado con las secuencias de los segmentos ARNt-Leu y ND1 permite agrupar en un clado monofilético a las especies de *Fissurella* del Atlántico y en otro clado monofilético a las especies litorales de la costa del Pacífico Sudoriental de Chile, con valores de replicación de 97% y 100% respectivamente (Figura 17).

En el clado monofilético del Pacífico se produce una politomía constituida por las agrupaciones de especies I y II, y el clado monofilético de *F. crassa*, con soportes de replicación superiores al 88%.

En el grupo I, destaca el “complejo latimarginata” (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. bridgesii* y *F. oriens*), que tiene un soporte de 99% de replicación. Su clado hermano está constituido por la agrupación de las especies hermanas y monofiléticas *F. radiosa* (98%) y *F. pulchra* (99%). El clado de *F. peruviana*, ocupa la posición basal en este grupo I (Figura 17)

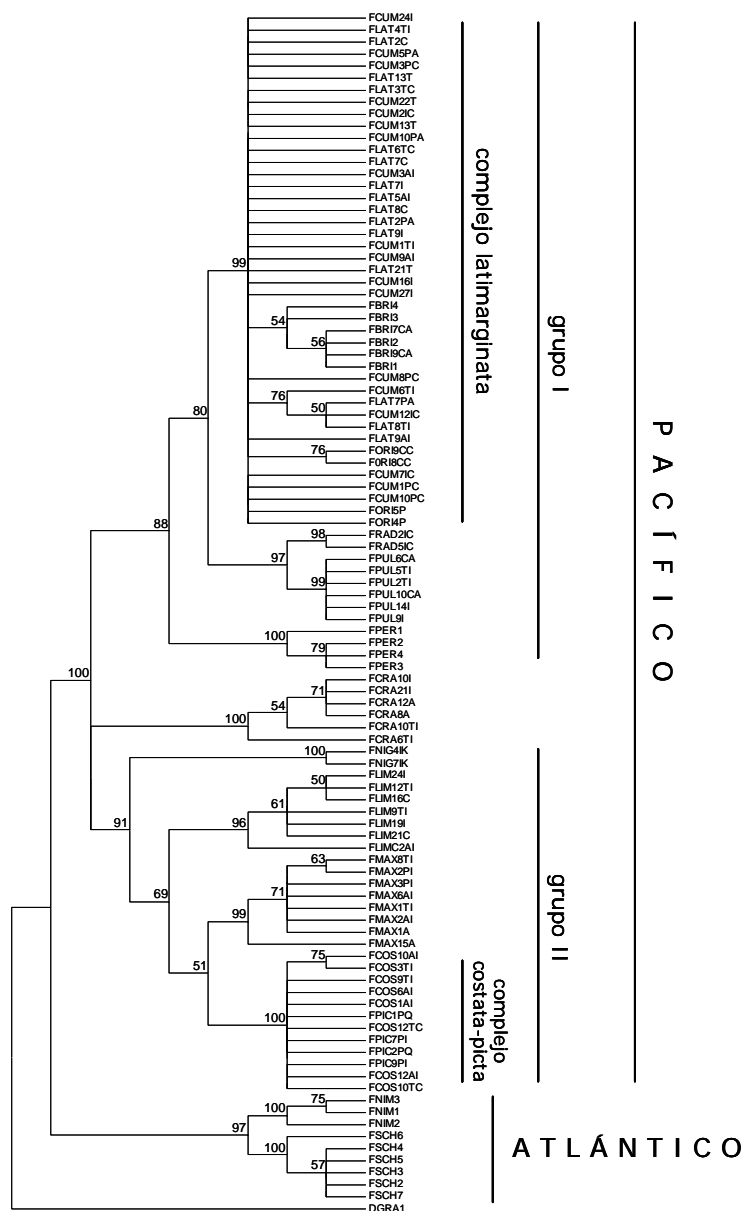


Figura 17. Árbol filogenético del subgénero *Fissurella* con secuencias de ARNt-Leu-ND1. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Sobre las ramas se señalan valores de replicación (x 2000) superiores al 50% y están colapsados los valores inferiores. El grupo externo para enraizar el árbol es DGRA1

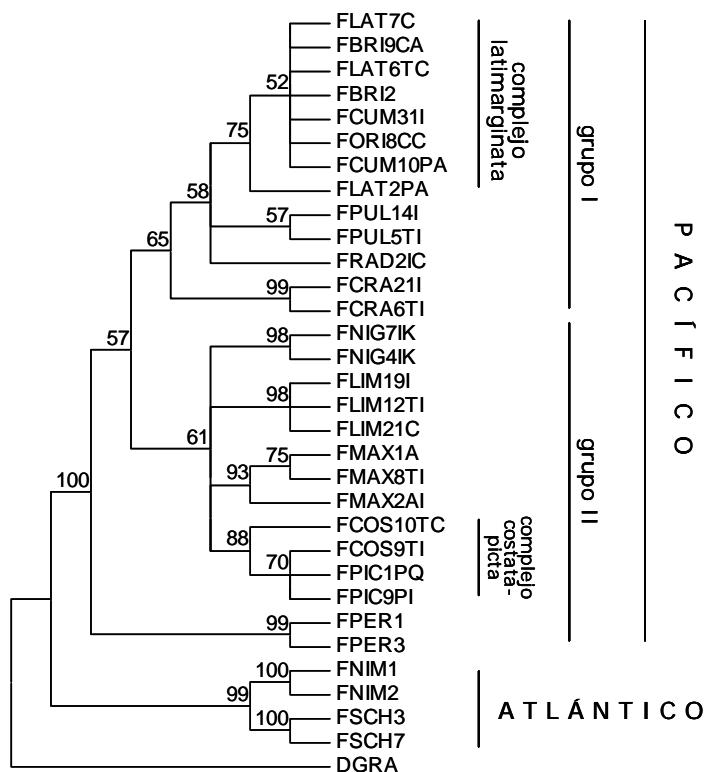
En el interior del grupo II, en la posición basal aparece el clado monofilético correspondiente a *F. nigra*. Además, el “complejo costata–picta” presenta, en este caso, como clado hermano, la especie *F. maxima*. Sin embargo los valores de replicación que soportan las relaciones dentro de este grupo son débiles (< 69%) (Figura 17).

#### **V.4. Filogenia molecular basada en secuencias parciales del gen ARNr 16S**

La reconstrucción de la filogenia con 32 secuencias del gen ARNr 16S, provenientes de 15 especies de *Fissurella* y 1 de *Diodora*, ha permitido la generación de un árbol filogenético, cuya topología presenta nodos con valor estadístico superior al 50% y otros con débil sustento estadístico que generan nodos colapsados (Figura 18).

Las especies que habitan en el Océano Atlántico son hermanas y forman un grupo distinto al grupo de especies del Pacífico, soportados con un valor muy alto de replicación (100%). Las relaciones basales, entre las especies y grupos del Pacífico presentan en general unos bajos valores de replicación (Figura 18).

La especie *F. peruviana* se sitúa como especie hermana del resto de especies del Pacífico. Sin embargo el soporte del nodo que agrupa al resto de especies es bajo (57%), sugiriendo una posible politomía implicando a dicha especie, al grupo I que incluye a las especies: *F. latimarginata*; *F. cumingi*, *F. bridgesii*, *F. oriens*, *F. pulchra*, *F. radiosa* y *F. crassa*; y al grupo II que engloba a *F. nigra*, *F. limbata*, *F. maxima*, *F. costata* y *F. picta*. Dentro de esos grupos las relaciones también están mal soportadas, con frecuente politomías (Figura 18).



**Figura 18.** Árbol de filogenia del subgénero *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, inferido con secuencias del gen ARNr 16S y enraizado con la especie externa *D. graeca*. Método de Neighbor-Joining, con modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación de los nodos superiores al 50% se señalan sobre las ramas y los inferiores han sido colapsados.

Ambos grupos, I y II, muestran una relación de grupos hermanos, emergiendo desde un nodo común. En el grupo I, se establece la organización polifilética de las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. bridgesii* y *F. oriens*, en el “complejo latimarginata”. Cada una de las otras especies de este grupo I, *F. pulchra*, *F. radiosa* y *F. crassa*, forman unidades monofiléticas. Sin embargo, el nodo para *F. pulchra*, no está soportado estadísticamente. En el grupo II, aunque se distingue una politomía total de sus ramas, se observa una



organización en monofilia de las especies *F. nigra*, *F. limbata* y *F. maxima*, pero por el contrario *F. costata* y *F. picta* se agrupan en un complejo polifilético “costata-picta” (Figura 18).

### **V.5. Filogenia molecular basada en secuencias parciales del gen H3**

En la reconstrucción del árbol con secuencias parciales del gen H3, se pone en evidencia que las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental se agrupan en total monofilia debido a la presencia de una única secuencia para todas esas especies. Por otra parte, las especies de *Fissurella* del Atlántico también forman una agrupación en monofilia, aunque entre ellas las diferencias evolutivas las separan en especies hermanas, agrupándose cada una de ellas en clado monofilético.

Este árbol reconstruido con secuencias adicionales provenientes de otros géneros de la familia Fissurellidae, provenientes del GenBank, permite constatar que el género más próximo a *Fissurella* es *Diodora*, existiendo una relación de hermandad entre ambos géneros. Ello justifica la utilización de *D. graeca* como un correcto grupo externo, para establecer las relaciones entre las especies del género *Fissurella*. Los otros géneros, no se logran resolver adecuadamente y forman una relación en politomía en posición basal de *Diodora* (Figura 19).

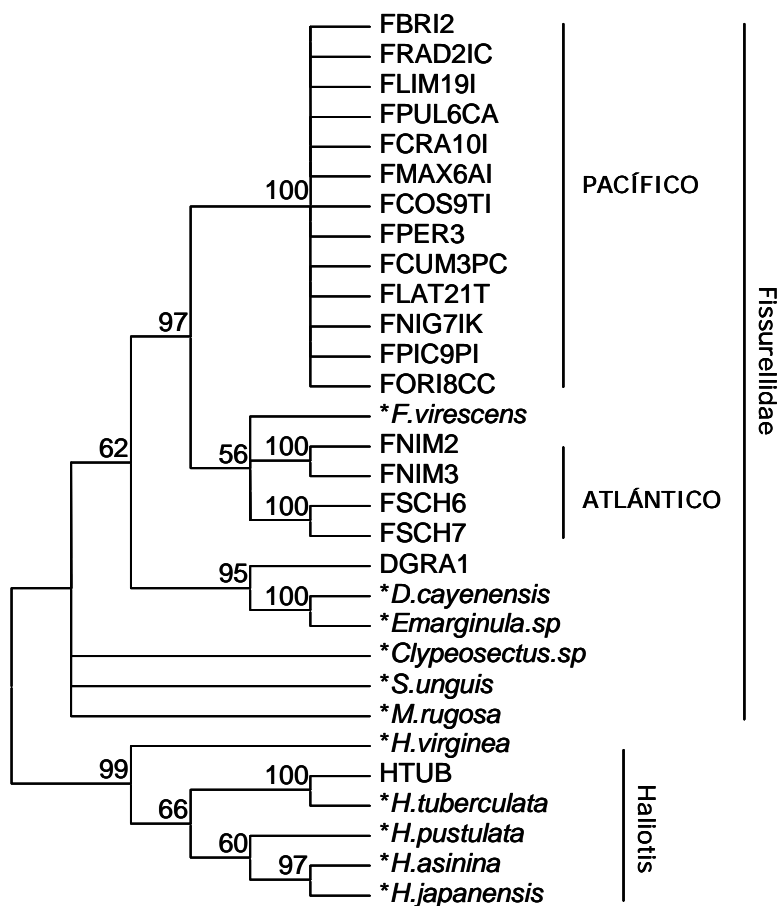


Figura 19. Árbol elaborado con secuencias del gen H3, mostrando las relaciones entre especies de distintos géneros de la familia Fissurellidae y entre *Fissurella* del Pacífico Sudoriental con *Fissurella* del Atlántico. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación (x 2000) superiores al 50% se indican sobre las ramas y los inferiores están colapsados. Especies de *Haliotis* corresponden al grupo externo. (\* Secuencias obtenidas del GenBank).

Las relaciones filogenéticas establecidas, a partir de esta primera aproximación bajo el criterio de distancias genéticas, permiten observar áreas de las topologías que presentan dificultades para su elucidación, así como la

presencia de nodos fiables. Las dificultades se sitúan fundamentalmente en las posiciones basales e implican a las especies *F. peruviana*, *F. nigra* y *F. crassa*.

En contraste, la falta de resolución de los juegos de datos aislados demanda la aplicación de la estrategia de evidencia total, combinando los datos de dichos juegos para obtener nuevos juegos de datos con un mayor contenido de información filogenética.

## **V.6. Filogenia molecular basada en secuencias parciales de ITS1 e ITS2**

El análisis de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Fissurella*, con distribución en el Pacífico Sudoriental, a partir de las secuencias nucleares ITS1 e ITS2 permite observar un patrón similar al inferido a partir de las secuencias mitocondriales pero con menor resolución, siendo reconocibles los grupos I y II definidos en las topologías mitocondriales.

La mayoría de los nodos, son soportados por escasos valores de replicación y con escasa longitud en la mayoría de las ramas, con independencia de la metodología filogenética utilizada.

Sin embargo, se reconoce la agrupación del “complejo latimarginata” y la posición cercana a éste de las especies *F. radiosa* y *F. pulchra*. El otro grupo compacto obtenido es el clado que agrupa a *F. costata* y *F. picta* frente a *F. limbata* y *F. maxima*. Por otro lado, en posiciones basales y divergentes se sitúan *F. peruviana*, *F. nigra* y *F. crassa* (Figura 20).

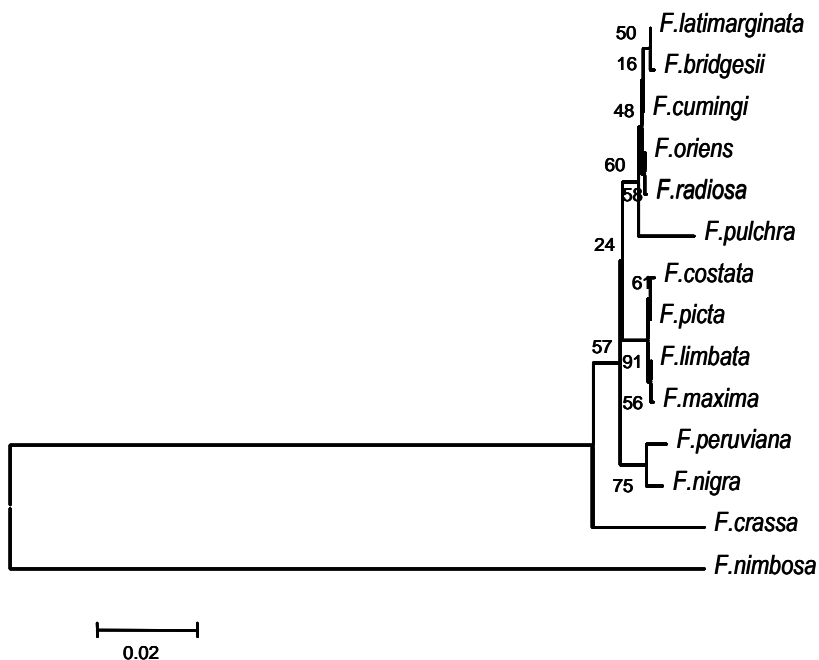


Figura 20. Árbol elaborado con secuencias de los interespaciadores ITS1 e ITS2, mostrando las relaciones entre especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental usando como grupo externo a *F. nimbosa* del Atlántico. Método de Neighbor-Joining y modelo de distancia de Tamura-Nei. Los valores de replicación (x 2000) se indican sobre las ramas.

### V.7. Filogenia molecular basada en juegos de datos mitocondriales combinados

El resultado del test de homogeneidad ( $P > 0.1$ ) (Farris *et al.* 1994) de las particiones correspondientes a las secuencias parciales del CYTB y ND1 ha permitido su uso de forma combinada en un único juego de datos (CYTB+ND1).

### V.7.A. Filogenia molecular basada en secuencias combinadas CYTB, ARNt-Leu y ND1.

Este nuevo juego de datos consiste en una matriz de 100 individuos con una secuencia de 771 pb, la cual incluye 348 pb del CYTB, 21 pb correspondientes al ARNt-Leu y 402 pb del gen ND1.

#### V.7.A.a. Análisis basados en el criterio de distancias genéticas

El modelo evolutivo seleccionado, para el juego de datos CYTB+ND1, ha sido el de HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano, con una distribución gamma de la tasa de mutación a lo largo de la secuencia), según el test jerarquizado de la relación de verosimilitudes (hLRT), y el de GTR+G (“General Time Reversible” con una distribución gamma), según el criterio informativo de Akaike (Posada & Crandall, 1998) (Tabla 18). Alternativamente en el programa MEGA, el modelo evolutivo se correspondió con el modelo de Tamura-Nei.

**Tabla 18. Parámetros de los modelos evolutivos seleccionados para el juego de datos combinado CYTB+ND1.**

	<b>Modelo HKY+G</b>	<b>Modelo GTR+G</b>
<b>Frecuencia de bases</b>		
A, C, G, T	0.1690, 0.1459, 0.2713, 0.4138	0.1811, 0.1295, 0.2868, 0.4026
<b>Matriz del modelo de substitución</b>	-	[A-C] = 1.1903 [A-G] = 33.0537 [A-T] = 2.1423 [C-G] = 5.5010 [C-T] = 58.8428 [G-T] = 1.0000
<b>TS/TV</b>	8.6268	-
<b>Variación de la tasa entre sitios</b>		
Proporción de sitios invariables	0	0
Parámetro de la distribución gamma	0.2495	0.2424



Las topologías obtenidas tanto a partir del programa MEGA (Figura 21. A) como de PAUP (Figura 21. B) son similares. Los divergentes grupos conteniendo las especies atlánticas y del Pacífico aparecen bien soportados. El grupo I es idéntico en ambas topologías. Incluye, además del “complejo latimarginata” a un clado hermano que contiene las especies hermanas *F. pulchra* y *F. radiosa*. La especie *F. peruviana* se sitúa en este clado, donde *F. crassa* es la especie más basal. Sin embargo, la asignación de estas dos últimas especies a este grupo I está soportada con bajos valores de replicación, especialmente en el árbol construido con PAUP.

La especie *F. nigra* aparece como clado hermano basal respecto al resto de especies del grupo II, con un buen soporte sólo en el caso del árbol obtenido de MEGA. En este grupo II se origina la única discrepancia entre ambas topologías. A partir de MEGA se obtiene un clado conteniendo a *F. limbata* y *F. maxima*, mientras que a partir de PAUP, *F. maxima* se agrupa con el “complejo costata-picta”. En cualquiera de los dos casos, estas relaciones no tienen un buen soporte de los valores de replicación (Figura 21. A y B).

#### **V.7.A.b. Análisis basado en el criterio de parsimonia**

Para la elaboración del árbol basado en máxima parsimonia a partir de 100 secuencias y con 2.000 replicaciones, y mediante una búsqueda heurística se han restringido los nodos correspondientes a cada especie. Así la topología intra-específica y dentro de los complejos “latimarginata” y “costata-picta” ha sido mantenida tal y como se obtiene en los análisis según el criterio de distancias. Con ello se obtiene una mayor viabilidad computacional.





El juego de datos combinado contiene secuencias codificantes (CYTB y ND1) y no codificantes (ARNt-Leu). Basándose en la dinámica mutacional observada, para cada posición específica del codón y para las secuencias no codificantes, se han asignados pesos a cada mutación ocurriendo en cada una de esas posiciones. Así estos pesos han sido 3, 10, 1 y 2 para la tercera, segunda y primera posición del codón y posiciones no codificantes, respectivamente.

Para cada tipo de sitio nucleotídico ha sido estimada una matriz de las tasas de sustituciones, siendo implementadas en el análisis de parsimonia.

Con estas implementaciones se tienen en cuenta las diferencias en las tasas de mutación entre las distintas posiciones consideradas y su diferente dinámica mutacional.

En la topología consenso de parsimonia, además de la divergencia Atlántico-Pacífico se distinguen los grupos I y II. La posición basal, ocupada por la especie hermana del resto de especies de cada grupo, está representada por *F. crassa* y *F. nigra* para el grupo I y II, respectivamente, aunque con bajos valores de replicación. El resto de relaciones inter-específicas son bien soportadas (Figura 22).

El grupo I, además de la basal *F. crassa*, incluye el clado de las especies *F. pulchra* y *F. radiosa* como hermano de las especies del “complejo latimarginata”. En una posición intermedia se sitúa *F. peruviana*.

En el grupo II, el clado de las especies *F. maxima* y *F. limbata* es hermano del que incluye al “complejo latimarginata”.

## V.7.A.c. Análisis basado en el criterio de máxima verosimilitud

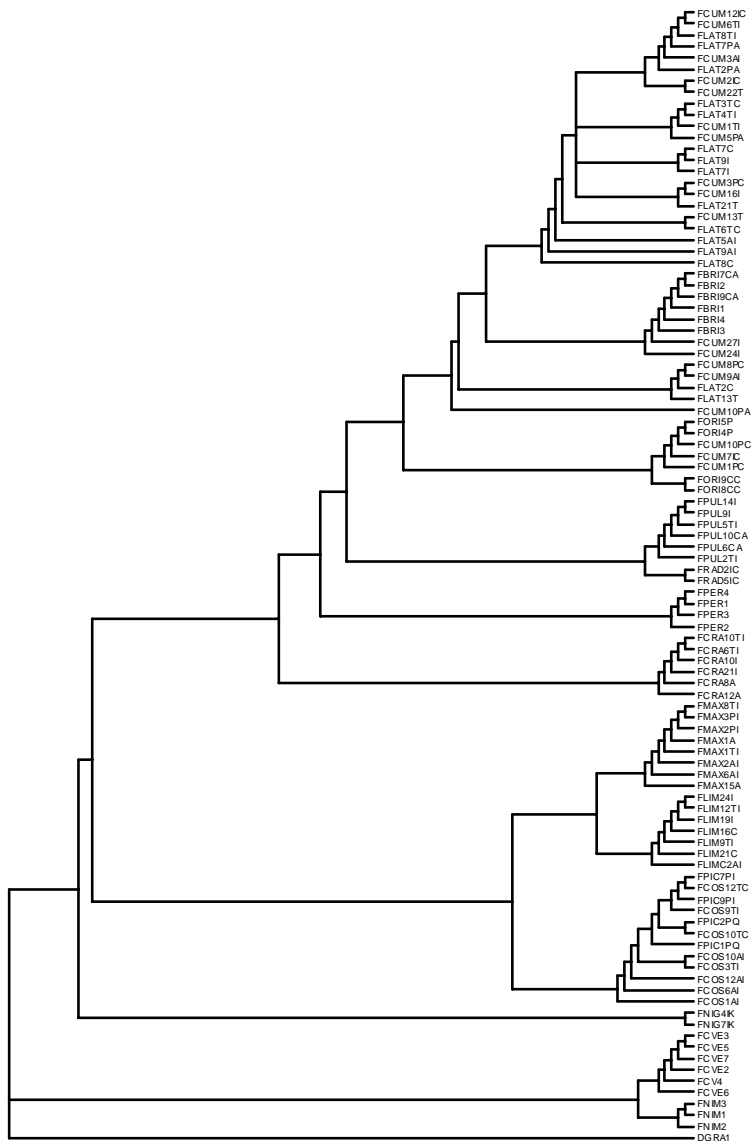


Figura 23. Árbol reconstruido según el criterio de máxima verosimilitud con el programa PAUP y a partir de las secuencias combinadas del CYTB, ARNt-Leu y ND1. El modelo evolutivo se corresponde con HKY+G. El valor  $-Ln = 4811.6096$ . Como grupo externo se ha usado a DGRA1.

La inferencia de las relaciones filogenéticas con el juego de datos de 100 secuencias, mediante máxima verosimilitud, fue llevada a cabo fijando la topología intraespecífica, al igual que en la reconstrucción por parsimonia y usando los modelos evolutivos estimados en los análisis basados en distancias, estos son los modelos de HKY+G y GTR+G.

La topología inferida bajo el modelo HKY+G, sitúa a *F. nigra* en una posición basal, como especie hermana del resto de las especies consideradas del Pacífico Sudoriental (Figura 23). Sin embargo, la implementación del modelo GTR+G la sitúa como especie basal del grupo I. En este grupo, además de localizarse el “complejo latimarginata” y el clado hermano conteniendo *F. pulchra* y *F. radiosa*; las especies *F. peruviana* y *F. crassa* se encuentran en las posiciones más basales (Figura 23).

El grupo II, dónde se sitúan los clados hermanos incluyendo a *F. maxima* y *F. limbata*, junto a *F. picta* y *F. costata* (Figura 23), es obtenido al usar el modelo HKY+G. En contraste, con el modelo GTR+G, se obtiene una relación polifilética entre el grupo I y los dichos clados hermanos.

#### **V.7.B. Filogenia molecular basada en secuencias combinadas CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S**

La escasa resolución de los juegos de datos previamente considerados en la zona basal de las topologías justifica el incremento del número de posiciones filogenéticamente informativas incorporando un gen mitocondrial relativamente conservado como el ARNr 16S. Este análisis ha sido llevado a cabo partiendo de un número reducido de individuos (N= 32) con una secuencia combinada (CYTB+ARNt-Leu+ND1+ARNr 16S) con una longitud de 1257 pb.

**V.7.B.a. Análisis basado en el criterio de distancias genéticas**

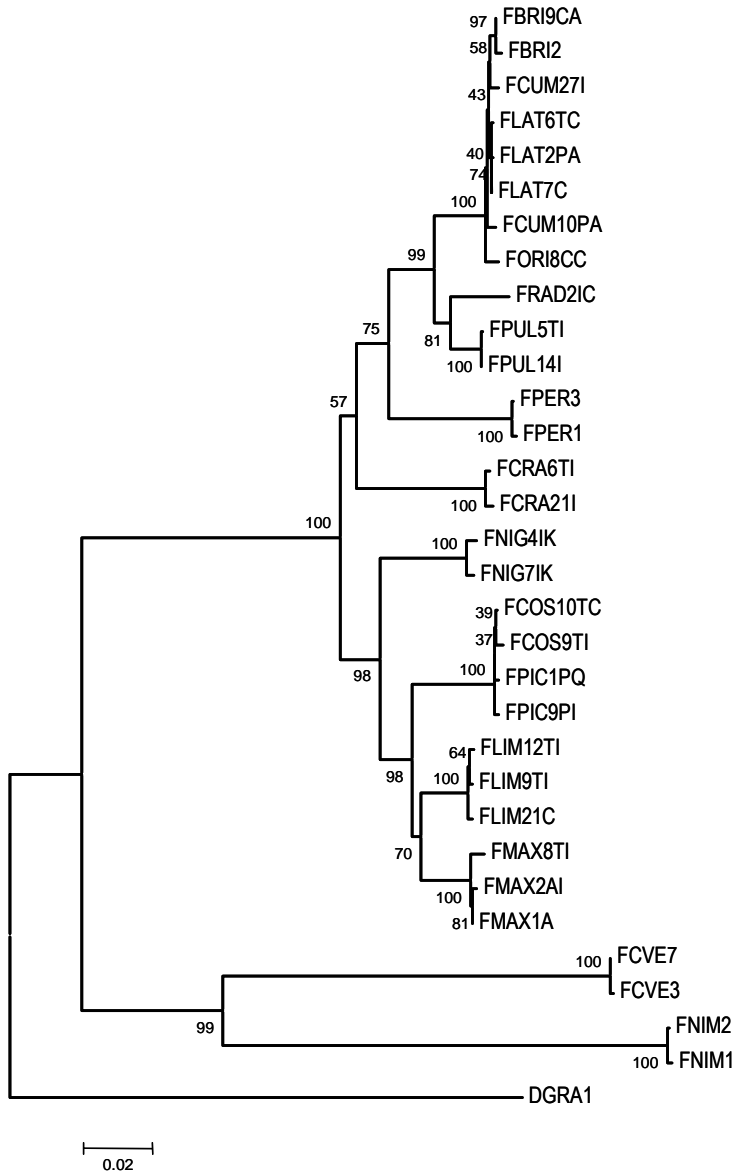
El análisis de distancias obtenido mediante el programa MEGA permite definir, con elevados valores de replicación, el grupo II (98%) y sus relaciones internas. Así, *F. nigra* se muestra como la especie basal de este grupo II, tras los clados conteniendo al “complejo costata-picta” y a las especies hermanas *F. maxima* y *F. limbata* (70%) (Figura 24).

Sin embargo, en el grupo I, la posición basal de *F. crassa* no se encuentra bien soportada (57%). La especie *F. peruviana* se muestra como especie hermana del resto de especies del grupo I (75%), donde las especies hermanas *F. radiosa* y *F. pulchra* (81%) constituyen el clado hermano del “complejo latimarginata” (Figura 24).

La selección de los modelos mutacionales más ajustados para este juego de datos mediante Modeltest (Posada & Crandall, 1998) (Tabla 19), permitió su implementación de los parámetros estimados en PAUP para la obtención de un nuevo árbol (Figura 25).

**Tabla 19. Parámetros de los modelos evolutivos seleccionados para el juego de datos combinado CYTB+ARNt -Leu+ND1+ ARNr 16S.**

	<b>Modelo HKY+I+G</b>	<b>Modelo GTR+I+G</b>
<b>Frecuencia de bases</b>		
A, C, G, T	0.2012, 0.1420, 0.2764, 0.3804	0.2127, 0.1322, 0.2887, 0.3664
<b>Matriz del modelo de sustitución</b>	-	[A-C] = 1.0000 [A-G] = 13.7736 [A-T] = 1.0000 [C-G] = 1.0000 [C-T] = 25.3522
<b>TS/TV</b>	7.8350	-
<b>Variación de la tasa entre sitios</b>		
Proporción de sitios invariables	0.3169	0.3222
Parámetro de la distribución gamma	0.3967	0.3989



**Figura 24.** Árbol basado en distancias de Tamura-Nei mediante el método de Neighbor-Joining en MEGA para 31 especímenes representativos de las 15 especies de *Fissurella* consideradas. El juego de datos utilizó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes indican los valores para 2.000 replicaciones.

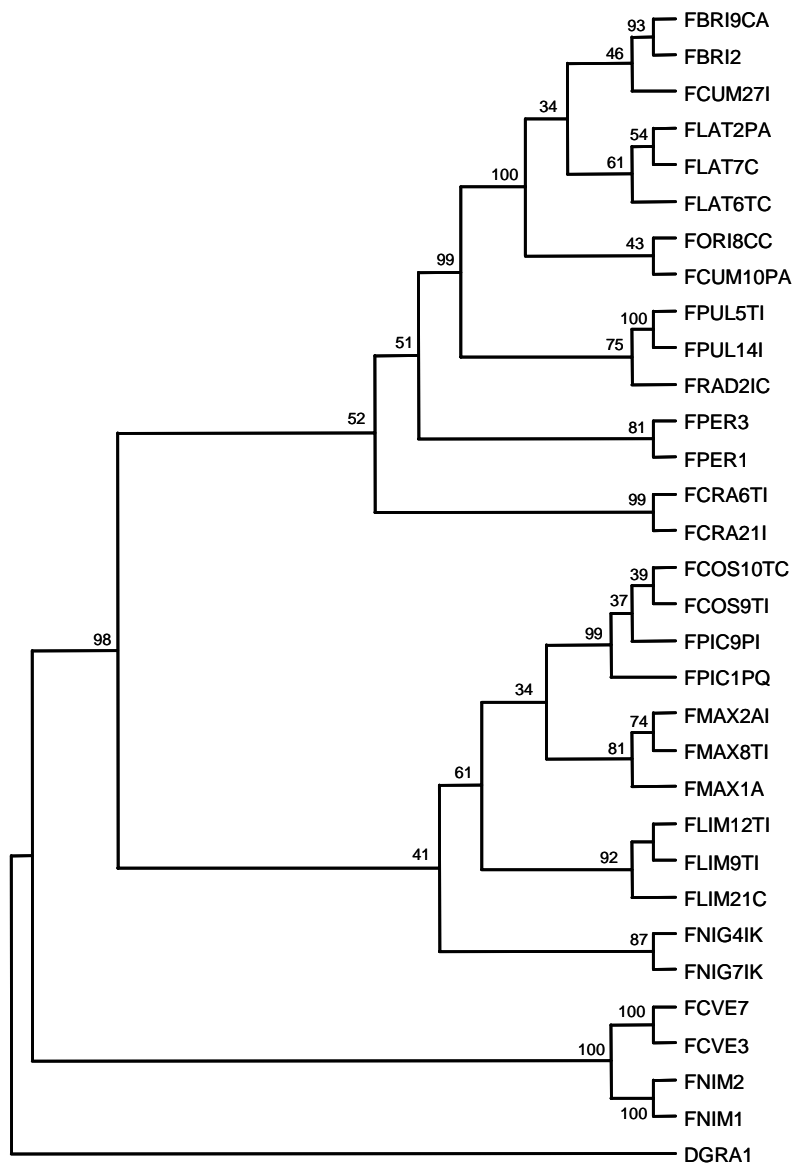


Figura 25. Árbol consenso basado en el modelo de Tamura-Nei mediante el método de Neighbor-Joining en PAUP para 31 especímenes representativos de las 15 especies de *Fissurella* consideradas. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes indican los valores para 2.000 replicaciones.



Los nodos que definen los grupos I y II fueron relativamente bien soportados (>70%). En el grupo I, *F. crassa* ocupa una posición basal, donde se encuentra también *F. peruviana*. Las especies *F. pulchra* y *F. radiosa*, se sitúan como el clado hermano del “complejo latimarginata”. En el grupo II, la posición basal se encuentra ocupada por *F. nigra*, mientras que *F. maxima* es la especie hermana del “complejo costata picta” con un escaso valor de replicación (38%) (Figura 26).

#### V.7.B.c. Análisis basado en el criterio de máxima verosimilitud

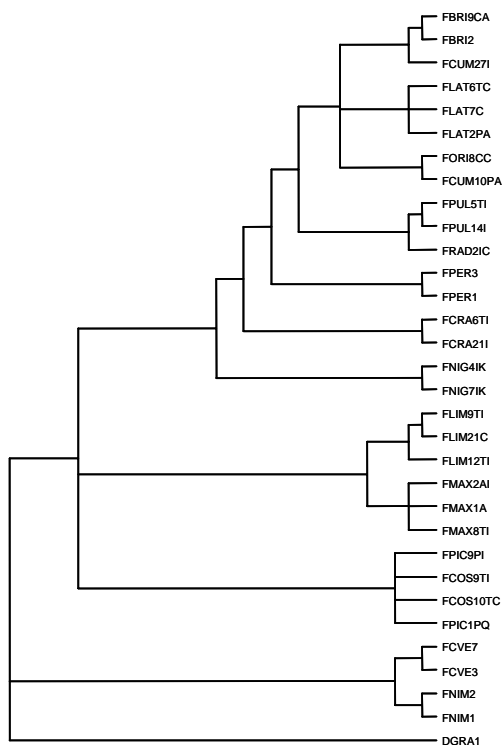


Figura 27. Árbol reconstruido según el criterio de máxima verosimilitud con el programa PAUP y a partir de las secuencias combinadas del CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. El modelo evolutivo se corresponde con GTR+G+I. El valor – Ln= 5992.3924. Como grupo externo se ha usado a DGRA1.



La reconstrucción de una topología basada en máxima verosimilitud, fue llevada a cabo asumiendo un modelo evolutivo GTR+I+G, seleccionado mediante Modeltest (Posada & Crandall, 1998).

Destaca en el árbol la politomía originada por el colapso de las ramas con una longitud cercana a 0. Así, se encuentran involucrados en esta politomía los clados pertenecientes al grupo II, incluyendo por un lado a *F. limbata* y *F. maxima* y por otro, a *F. picta* y *F. costata*, y el clado que contiene al grupo I de especies. Dentro de este último clado, *F. nigra* ocupa la posición basal, seguida de *F. crassa*, y *F. peruviana*. El clado monofilético conteniendo a *F. pulchra* y *F. radiosa*, es el clado hermano del clado que contiene al polifilético “complejo latimarginata” (Figura 27).

#### **V.7.B.d. Análisis basado en inferencia bayesiana**

Los resultados a partir del juego de secuencias completo mitocondrial y la reconstrucción de la topología por inferencia bayesiana, presentan una topología congruente con análisis previos. Así se recobra la monofilia del “complejo latimarginata”, con relaciones polifiléticas en su interior, y *F. pulchra* y *F. radiosa* en un clado hermano de dicho complejo. *F. peruviana* y *F. crassa* se sitúan en las posiciones intermedias del grupo I, en el que *F. nigra* se localiza como la especie más basal, aunque con escaso soporte (0,58). El grupo II incluye dos clados hermanos. El primero contiene polifiléticamente a *F. picta* y *F. costata*, mientras que el segundo incluye a las monofiléticas *F. limbata* y *F. maxima* (Figura 28).

La monofilia observada para las especies analizadas del Pacífico Sudoriental está bien soportada, con la existencia del clado hermano atlántico, conteniendo a *F. schrammii* y *F. nimbosa* (Figura 28).

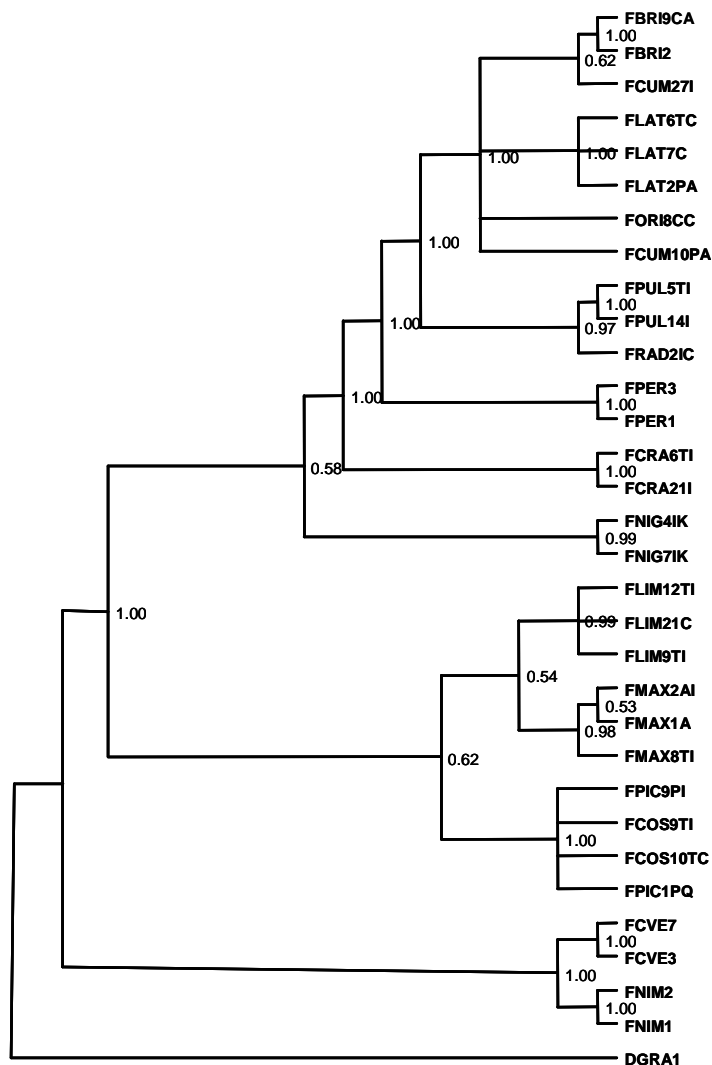


Figura 28. Árbol basado en la inferencia bayesiana realizado mediante el programa Mr Bayes versión 3.1. El juego de datos utilizado incluyó secuencias parciales de los genes CYTB, ARNt-Leu, ND1 y ARNr 16S. DGRA1 fue utilizada como grupo externo. Los números adyacentes a los nodos indican los valores de probabilidad “a posteriori”.

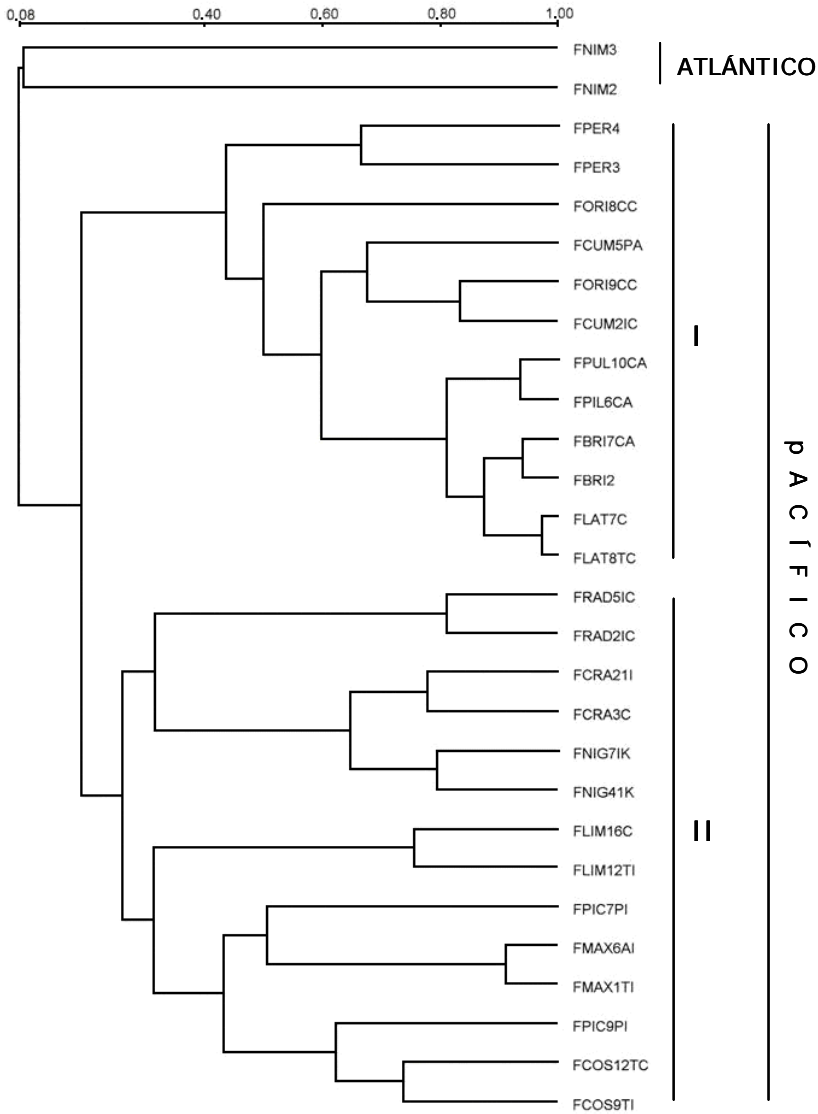


Destaca la obtención de patrones comunes para las especies del denominado “complejo latimarginata”, confirmando a nivel del genómico nuclear, la estrecha relación estimada a partir de los análisis de secuencias mitocondriales. Patrones similares a éstos han sido observados para *F. pulchra* y *F. peruviana*, también situados, junto con el “complejo latimarginata” dentro del grupo I de especies. Sin embargo, el patrón observado en *F. radiosa*, difiere del mostrado por *F. pulchra*, las cuales son especies hermanas en los análisis de secuencias. También destacan por su similitud los patrones de *F. crassa* y *F. nigra*.

La inferencia de la filogenia obtenida desde estos segmentos, mediante el método de UPGMA, permite constatar la relación de monofilia de los organismos de la especie *F. nimbosea* que habitan en el Atlántico y también la asociación monofilética de todas las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental (Figura 30).

En el clado de especies del Pacífico, aparecen dos grupos. El primer grupo (I) está formado por las especies, *F. oriens*, *F. cumingi*, *F. bridgesii* y *F. latimarginata* (“complejo latimarginata”), *F. peruviana* y *F. pulchra*. En este grupo, *F. peruviana* diverge tempranamente de las otras especies (Figura 30).

En el segundo grupo (II), se distinguen dos clados divergentes. El primero de ellos contiene las especies *F. radiosa*, *F. crassa* y *F. nigra*, siendo éstas dos últimas las implicadas en la zona basal de los análisis de secuencias. Por otro lado, el segundo clado asocia a las especies *F. maxima*, *F. limbata*, *F. picta* y *F. costata*. En este grupo, *F. costata* y *F. picta* presentan una estrecha relación, logrando asociarse en monofilia algunos de sus miembros (Figura 30).



**Figura 30.** Filogenia del subgénero *Fissurella*, reconstruida por el método de UPGMA, y la obtención de índices de similitud, debido a la presencia o ausencia de bandas comunes en los patrones de bandeo generados por técnica de RAPD, para cada especie analizada.

## VI. Autenticación de especies del género *Fissurella* mediante PCR-RFLP

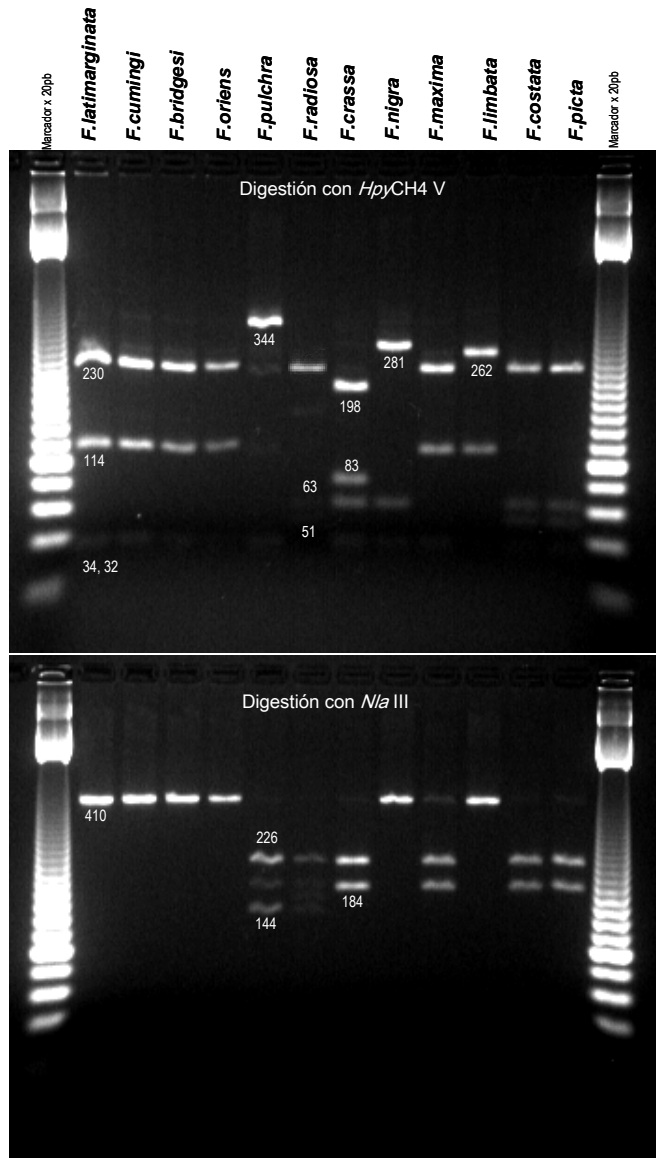
La metodología de autenticación de especies de *Fissurella* que habitan en la costa de Chile, se realizó en base a la información proveniente de las secuencias del citocromo b. El fragmento amplificado del gen mitocondrial CYTB, contiene 410 pares de bases, cebadores incluidos, portando la suficiente variabilidad nucleotídica para ser utilizado en una metodología de PCR-RFLP con el fin de identificar las diversas especies de *Fissurella* presentes en la costa chilena y con interés comercial.

Las enzimas de restricción *Hpy*CH4 V y *Nla* III detectan varios sitios polimórficos específicos de cada especie analizada, dando lugar a la generación de patrones de restricción específicos, con fragmentos de tamaño diferentes, según se observa en la Figura 31.

En la selección de las dianas de restricción diagnóstico se tuvo en cuenta la ausencia de variabilidad intra-específica en los individuos analizados.

Sin embargo, las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III producen patrones de restricción idénticos, tanto para las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*, incluidas dentro del grupo denominado “complejo latimarginata”, como para las especies *F. picta* y *F. costata*, del “complejo costata-picta” (Figura 31).

El “complejo latimarginata”, presenta dianas de restricción únicamente para la enzima *Hpy*CH4 V, originando 4 fragmentos que constituyen el patrón de restricción A. Las otras especies, *F. pulchra*, *F. radiosa*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. limbata* y el “complejo costata-picta” presentan los patrones B, C, D, E, F y C, respectivamente (Tabla 20).



**Figura 31.** Geles de agarosa mostrando los perfiles de restricción tras la digestión del producto de PCR obtenidos de diversas especies de *Fissurella* y situado en el citocromo b, con las enzimas *HpyCH4 V* y *Nla III*.

En el caso del patrón C, algunos de los individuos morfológicamente clasificados como *F. costata* y *F. picta*, pueden presentar una variante del patrón (C)<sup>a</sup>, debido a la ausencia de corte del nucleótido 379, a causa de una mutación puntual en el seno de la diana de restricción. *F. maxima* presenta un patrón idéntico al del grupo de *F. latimarginata* (A), sin embargo tras la digestión con *Nla* III, se obtiene un patrón (B) diferente al presentado por el grupo de *F. latimarginata* (sin corte, O).

**Tabla 20. Recopilación de los cortes producidos y de los fragmentos generados tras la digestión del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III. (A) a (F): patrones de restricción, (O): sin corte.**

Especie	Enzima			
	<i>Hpy</i> CH4 V ( <i>Cvi</i> RI)		<i>Nla</i> III	
	Sitios de Corte TG'CA	Tamaño Fragmentos originados (pb) <sup>b</sup>	Sitios de Corte CATG'	Fragmentos originados (pb) <sup>b</sup>
<i>F. latimarginata</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	-(O)
<i>F. cumingi</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	-(O)
<i>F. bridgesii</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	-(O)
<i>F. oriens</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	-(O)
<i>F. pulchra</i>	35, 379	32, 34, 344 (B)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. radiosa</i>	35, 98, 149, 379	32, 34, 63, 51, 230 (C)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. crassa</i>	35, 98, 181, 379	32, 34, 63, 83, 198 (D)	185	184, 226 (B)
<i>F. nigra</i>	35, 98, 379	32, 34, 63, 281 (E)	-	-
<i>F. maxima</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	185	184, 226 (B)
<i>F. limbata</i>	35, 149	34, 114, 262 (F)	(185) <sup>a</sup>	(184,226) <sup>a</sup> (O)/(B)
<i>F. costata</i>	35, 98, 149, (379) <sup>a</sup>	32, 34, 63, 51, 230(C) / (34, 51,63, 262) <sup>a</sup> (C) <sup>a</sup>	185	184, 226 (B)
<i>F. picta</i>	35, 98, 149, (379) <sup>a</sup>	32, 34, 63, 51, 230(C) / (34, 51,63, 262) <sup>a</sup> (C) <sup>a</sup>	185	184, 226 (B)

<sup>a</sup> Diana con polimorfismo intraespecífico, <sup>b</sup> Longitud estimada para la cadena 5' - 3'

Para esta enzima, *Nla* III, se distinguen 3 patrones de restricción, O (sin corte), A y B. En el caso de *F. limbata* y para esta enzima, se ha observado, en algunos individuos, la falta del punto de corte situado en la base 185, pudiendo obtenerse los patrones O y B. Sin embargo el patrón F, obtenido con la enzima



*Hpy*CH4 V, permite la clara diferenciación de esta especie, presentando un patrón combinado FO /FB (Tabla 20).

## **VII. Análisis de la estructura genética poblacional de especies del género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental**

En base a la dispersión de las áreas de muestreo específicas, distribuidas por las diversas áreas biogeográficas a lo largo de la costa de Chile, se seleccionaron cuatro especies para evaluar su estructura genética poblacional: *F. crassa*, *F. limbata*, *F. latimarginata* y *F. cumingi*. Estas dos últimas agrupadas como la unidad *F. latimarginata*-*F. cumingi* ya que como muestran los análisis filogenéticos, formarían parte de un “complejo *latimarginata*”.

### **VII.1. Estructura genética poblacional de *Fissurella crassa***

La estructura genética poblacional de *F. crassa* fue estimada a partir del segmento ND1 (ARNt-Leu-ND1) compuesto por 423 pb obtenidos de 63 especímenes provenientes de las tres zonas de muestreo de *F. crassa*, distribuidas en la provincia Peruviana y margen de la zona transicional de contacto con el área intermedia, de las provincias biogeográficas definidas para el Pacífico Sudoriental (Camus, 2001).

#### **VII.1.A. Variabilidad genética en las secuencias ND1**

Las secuencias ND1 analizadas carecen de inserciones y deleciones. Presentan un número de 12 sitios variables, de los cuales 4 son de tipo “singleton” y 8 son informativos para parsimonia. En los sitios variables se constata que las sustituciones son predominantemente de tipo transicional, encontrándose en la población de Tilgo una relación de 6 transiciones por 1

transversión, mientras que en la de Coloso la razón es de 3 a 2. Como resultado se detectaron 15 haplotipos distintos. En consecuencia, para la especie *F. crassa* el valor de diversidad haplotípica es de 0,63 y el de diversidad nucleotídica de 0,002.

**Tabla 21. Variabilidad genética a nivel poblacional de *Fissurella crassa*.**

Población	n	hap	sp	ts	tv	$\pi$	$h$
Iquique	23	8	7	5	2	0,00617 $\pm$ 0,00382	0,7589 $\pm$ 0,0849
Coloso	25	5	5	3	2	0,00333 $\pm$ 0,00235	0,3633 $\pm$ 0,1198
Tilgo	15	8	7	6	1	0,00509 $\pm$ 0,00335	0,7905 $\pm$ 0,1049

hap: número de haplotipos; sp: sitios polimórficos; ts: número de transiciones; tv: número de transversiones;  $\pi$ : diversidad de nucleótidos;  $h$ : diversidad haplotípica

A nivel poblacional, la mayor diversidad nucleotídica se observa en la población de *F. crassa* de Tilgo e Iquique y la menor en Coloso (Tabla 21).

**Tabla 22. Frecuencias de haplotipos en tres poblaciones de *Fissurella crassa*.**

Haplotipos	Iquique (N=23)		Coloso (N=25)		Tilgo (N=15)	
	Frecuencia		Frecuencia		Frecuencia	
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
1	11	0,478	20	0,80	7	0,467
2	1	0,44	0	0	0	0
3	2	0,87	0	0	0	0
4	1	0,44	0	0	1	0,067
5	2	0,87	1	0,04	0	0
6	3	0,13	2	0,08	0	0
7	2	0,87	0	0	2	0,133
8	1	0,44	0	0	0	0
9	0	0	1	0,04	0	0
10	0	0	1	0,04	0	0
11	0	0	0	0	1	0,067
12	0	0	0	0	1	0,067
13	0	0	0	0	1	0,067
14	0	0	0	0	1	0,067
15	0	0	0	0	1	0,067

Abs: absoluta. Rel: relativa

Por otra parte, la mayor cantidad de haplotipos diferentes fue de 8, detectada en la población de *F. crassa* de Iquique y de Tilgo, mientras que en la población de Coloso la cantidad de haplotipos fue de 5 (Tabla 21).

Entre las poblaciones hay especímenes que comparten haplotipos comunes, pero las frecuencias de éstos son variables entre las distintas poblaciones. Además, hay haplotipos exclusivos o privados que sólo están presentes en una población. Las frecuencias de los 20 haplotipos constatados en las poblaciones de *F. crassa* se desglosan en la Tabla 22.

#### **VII.1.B. Relaciones entre los haplotipos de *Fissurella crassa***

El haplotipo 1 (hap. 1) es el más frecuente en las tres poblaciones analizadas, aunque se encuentra especialmente representado en la población de Coloso. A partir de él irradian, en forma de estrella, la mayoría del resto de haplotipos detectados, diferenciándose de éste en una única mutación. Estos haplotipos irradiados aparecen en baja frecuencia y principalmente en las poblaciones de Iquique y Tilgo (Figura 32).

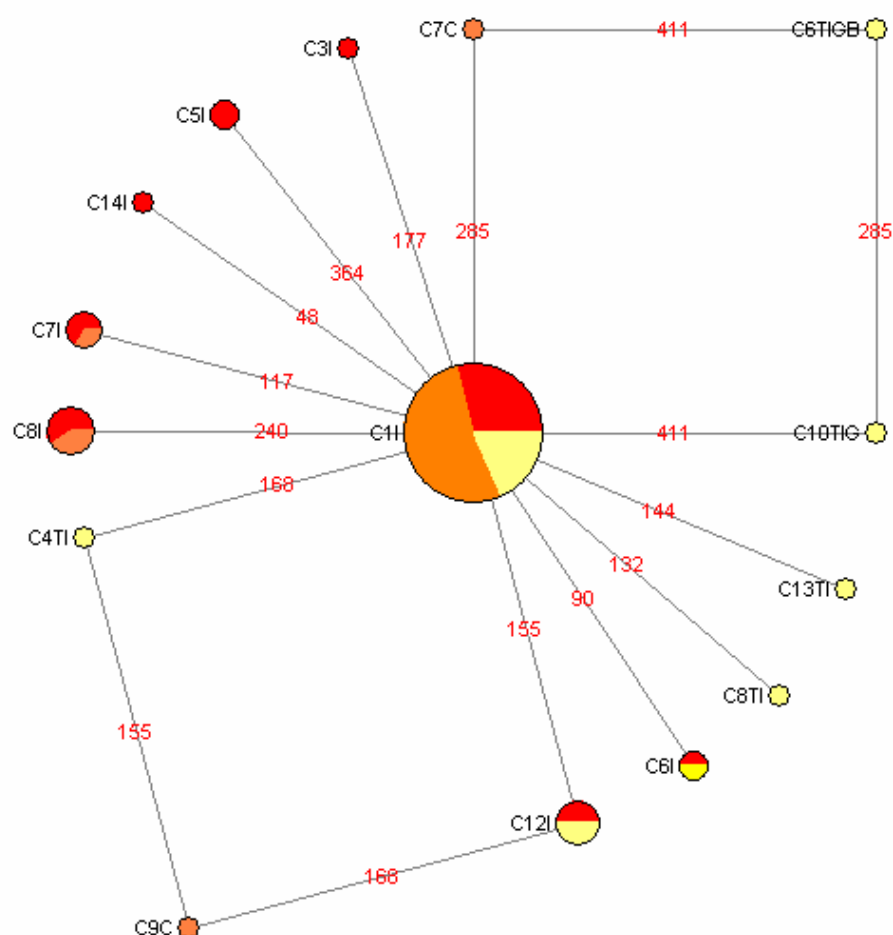


Figura 32. Entramado de haplotipos de la secuencia ND1, obtenidos para la especie *F. crassa*, basado en el algoritmo “median-joining”. Cada círculo indica un haplotipo y su área es proporcional a la frecuencia absoluta de haplotipos. La fracción de cada círculo indica la proporción de haplotipos presente en las poblaciones estudiadas mediante el código de color: ● Iquique, ● Coloso, ● Tilgo.

### VII.1.C. Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos

Los resultados del análisis de heterogeneidad detectan diferencias significativas en la frecuencia de los haplotipos entre las poblaciones ensayadas ( $P = 0,037$ ).

### VII.1.D. Análisis de los estadísticos poblacionales

Los valores del estadístico  $F_{ST}$  linearizados entre poblaciones son bajos y no significativos (Tabla 23).

**Tabla 23. Matriz de estimaciones de  $F_{ST}$  entre tres poblaciones de *F. crassa*. Encima de la diagonal se indican las estimaciones de  $Nm$  a partir de estimaciones de  $F_{ST}$  linearizados.**

Población	Iquique	Coloso	Tilgo
Iquique	-	inf.	43,72
Coloso	-0.01485	-	37,55
Tilgo	0,01131	0,01314	-

Los valores de  $F_{ST}$  no son significativos, ( $P > 0,05$ )

### VII.1.E. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

El análisis fue llevado a cabo mediante la agrupación jerarquizada de las 3 poblaciones analizadas en tres grupos alternativos. El AMOVA realizado para las distintas agrupaciones de poblaciones de *F. crassa* (estructura A, B, y C), reveló muy bajos valores de variación entre los grupos y entre las poblaciones, reflejados en los bajos valores de los estadísticos  $\Phi_{CT}$  y  $\Phi_{SC}$ . A nivel intra-poblacional se obtienen los más altos porcentajes de variación en todas las estructuras poblacionales analizadas y bajos valores para el estadístico  $\Phi_{ST}$ . Ninguna de las estimaciones de los estadísticos es significativa (Tabla 24).

**Tabla 24. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de *F. crassa*, en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1.**

Fuente de Variación	Varianza de componentes		% variación	Estadístico $\Phi$	$P$
<b>Estructura A</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	-0,00666	-0,66	$\Phi_{CT} = -0,00662$	0,67742
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,00094	0,09	$\Phi_{SC} = 0,00093$	0,52981
En la población	$\sigma^2_c$	1,41692	100,57	$\Phi_{ST} = -0,00569$	0,46334
<b>Estructura B</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	0,03095	3,03	$\Phi_{CT} = 0,03032$	0,33138
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	-0,02100	-2,06	$\Phi_{SC} = -0,02121$	0,57185
En la población	$\sigma^2_c$	1,01071	99,02	$\Phi_{ST} = 0,00975$	0,48583
<b>Estructura C</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	-0,03208	-3,21	$\Phi_{CT} = -0,03214$	1,00000
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,01975	1,98	$\Phi_{SC} = 0,01916$	0,50147
En la población	$\sigma^2_c$	1,01071	101,24	$\Phi_{ST} = -0,01236$	0,50538

**Estructura A; B; C.** Cada una con 2 grupos.

**A:** (Coloso-Tilgo), (Iquique)

**B:** (Iquique-Coloso), (Tilgo)

**C:** (Iquique-Tilgo), (Coloso)

### VII.1.F. Historia demográfica

Las distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distributions”) son unimodales, como las esperadas en poblaciones que han experimentado una reciente expansión demográfica (Figura 33). Así, las distribuciones de las poblaciones de Iquique y Tilgo son muy similares, ajustándose a la distribución esperada bajo un modelo de expansión súbita y, congruentemente, con valores significativos de  $R_2$ .

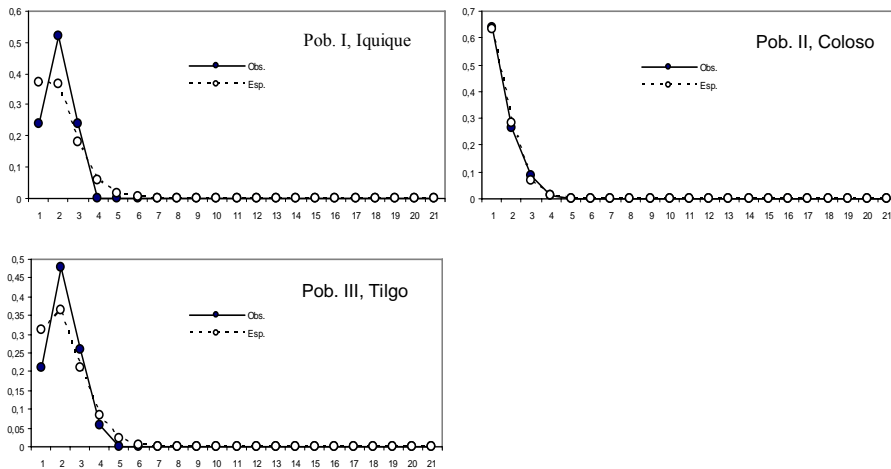
Sin embargo, para la población de Coloso la distribución observada encaja tanto en el modelo de expansión como en el de tamaño constante. En consecuencia, el valor de  $R_2$  es mayor y no significativo (Tabla 25).

**Tabla 25. Parámetros estimados para las poblaciones de *Fissurella crassa*.**

Población	$\tau$	$\Theta_0$	$\Theta_1$	MAE	H Ri	Tajima D	Fu Fs	$R_2$
I, Iquique	0,996	0	1000	0,5435	0,2160	-1,5011	-4,639***	0,0712***
II, Coloso	0,318	0,156	1000	0,1238	0,1756	-1,8407*	-2,866**	0,0939
III, Tilgo	1,162	0	1000	0,7023	0,1624	-1,6576	-5,337***	0,0761***

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

El perfil de la distribución de la población de Coloso, con un valor de  $\tau$  muy bajo, es claramente distinguible del de las otras poblaciones, presentando una reciente coalescencia de sus haplotipos, los cuales mayoritariamente se diferencian en una única y reciente mutación (Figura 33).


**Figura 33. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de *F. crassa*.**

## VII.2. Estructura genética poblacional de *Fissurella limbata*

Los haplotipos obtenidos para el segmento mitocondrial ND1 (ARNt-Leu-ND1) poseen una secuencia de 423 pb, en los 60 especímenes de *F. limbata* de las tres áreas analizadas (Iquique, Coloso y Tilgo), distribuidas entre la provincia Peruviana y margen de la zona transicional de contacto con el área intermedia.

### VII.2.A. Variabilidad genética en las secuencias ND1

Las secuencias de ND1 de los individuos de las poblaciones de *F. limbata* estudiadas, no poseen sitios con inserciones ni deleciones de nucleótidos. Sin embargo, tienen varios sitios polimórficos, concretamente 10, 9 y 8 para la población de Iquique, Coloso y Tilgo, respectivamente. Las mutaciones de nucleótidos en los sitios corresponden mayoritariamente a sustituciones por transición.

**Tabla 26. Variabilidad genética a nivel poblacional de *Fissurella limbata*.**

Población	n	hap	sp	ts	tv	$\pi$	$h$
Iquique	22	11	10	9	1	$0,00522 \pm 0,00334$	$0,8788 \pm 0,0528$
Coloso	23	9	9	8	1	$0,00576 \pm 0,00361$	$0,6838 \pm 0,1063$
Tilgo	15	9	8	7	1	$0,01040 \pm 0,00610$	$0,9143 \pm 0,0519$

hap: número de haplotipos; sp: sitios polimórficos; ts: número de transiciones; tv: número de transversiones;  $\pi$ : diversidad de nucleótidos;  $h$ : diversidad haplotípica

La relación de transición a transversión es de 9, 8 y 7 a una, en las poblaciones de *F. limbata* de Iquique, Coloso y Tilgo respectivamente; pero la mayor diversidad nucleotídica la muestra la población de Tilgo, duplicando a las que ostentan las otras dos poblaciones (Tabla 26).

Para la especie *F. limbata* el valor de diversidad haplotípica es de 0,845 y el de diversidad nucleotídica de 0,004.



**Tabla 27. Listado de haplotipos en tres poblaciones de *Fissurella limbata* (Abs: absoluta; Rel: relativa).**

Haplotipos	Iquique (n=22)		Coloso (n=23)		Tilgo (n=15)	
	Frecuencia		Frecuencia		Frecuencia	
	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
1	7	0,318	13	0,562	2	0,133
2	3	0,136	1	0,044	0	0
3	3	0,136	0	0	4	0,267
4	1	0,046	0	0	0	0
5	1	0,046	0	0	0	0
6	1	0,046	1	0,044	2	0,133
7	1	0,046	0	0	0	0
8	2	0,091	1	0,044	0	0
9	1	0,046	0	0	0	0
10	1	0,046	2	0,087	1	0,067
11	1	0,046	0	0	0	0
12	0	0	1	0,044	0	0
13	0	0	2	0,087	0	0
14	0	0	1	0,044	0	0
15	0	0	1	0,044	0	0
16	0	0	0	0	1	0,067
17	0	0	0	0	1	0,067
18	0	0	0	0	2	0,133
19	0	0	0	0	1	0,067
20	0	0	0	0	1	0,067

En la población de *F. limbata* de Coloso el haplotipo común (hap. 1) está presente en más de la mitad de los individuos, mientras que en la población de Tilgo su frecuencia decae a un 13 % de individuos portadores, destacando en ella la elevada proporción de haplotipos exclusivos o privados. (Tabla 27).

Entre las tres poblaciones existen 20 haplotipos diferentes, de los cuales tres son comunes entre ellas, 3 lo son entre dos poblaciones y los



en general, en una única mutación. Estos haplotipos y aquellos más divergentes destacan por su presencia en la población de Tilgo (Figura 34).

### VII.2.C. Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos

Las frecuencias haplotípicas presentes en cada una de las poblaciones (Iquique, Coloso y Tilgo) de *F. limbata* consideradas muestran diferencias significativas ( $P = 0,016$ ).

### VII.2.D. Análisis de los estadísticos poblacionales

En coincidencia con este planteamiento los valores de  $F_{ST}$  estimados entre las poblaciones permiten respaldar resultados anteriores de que *F. limbata* de Tilgo posee haplotipos que las diferencian significativamente de las poblaciones de Iquique y Coloso. Así, se observan valores significativos de  $F_{ST}$  en las comparaciones en las que se encuentra involucrada la población de Tilgo.

**Tabla 28. Matriz de estimaciones de  $F_{ST}$  entre tres poblaciones de *F. limbata*. Encima de la diagonal se indican las estimaciones de  $Nm$  a partir de estimaciones de  $F_{ST}$  linearizados.**

Población	Iquique	Coloso	Tilgo
Iquique	-	58,69	2,35
Coloso	0,00845	-	2,67
Tilgo	0,17512*	0,15749*	-

\* $P < 0,01$  (1023 permutaciones)

Para dichos valores, las estimaciones de  $Nm$  indican valores lo suficientemente escasos para indicar un limitado flujo génico entre la población de Tilgo y el resto (Tabla 28).

## VII.2.E. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Tabla 29. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para tres poblaciones de *F. limbata*, en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1

Fuente de Variación	Varianza de componentes		% variación	Estadístico $\Phi$	$P$
<b>Estructura A</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	-0,16946	-10,54	$\Phi_{CT} = -0,10536$	0,65396
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,36090	22,44	$\Phi_{SC} = 0,20300$	0,43206
En la población	$\sigma^2_c$	1,41692	88,10	$\Phi_{ST} = 0,11903$	0,00000
<b>Estructura B</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	0,43913	23,79	$\Phi_{CT} = 0,23788$	0,34213
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	-0,01004	-0,54	$\Phi_{SC} = -0,00714$	0,05083
En la población	$\sigma^2_c$	1,41692	76,76	$\Phi_{ST} = 0,23244$	0,00098
<b>Estructura C</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	-0,36003	-23,12	$\Phi_{CT} = -0,23120$	1,00000
Entre poblaciones					
dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,50037	32,13	$\Phi_{SC} = 0,26098$	0,43011
En la población	$\sigma^2_c$	1,41692	90,99	$\Phi_{ST} = 0,09012$	0,00196

Estructura A; B; C. Cada una con 2 grupos.

A: (Coloso-Tilgo), (Iquique)    B: (Iquique-Coloso), (Tilgo)    C: (Iquique-Tilgo), (Coloso)

Mediante AMOVA (Tabla 29), se observan valores significativos de  $\Phi_{ST}$  en las diferentes agrupaciones de poblaciones realizadas (estructura A, B y C), con elevados porcentajes de variación, superiores al 75%. En la estructura A y C, en la cual la población de Tilgo, forma parte del grupo con la población de Coloso e Iquique respectivamente se observa un porcentaje de variación superior al 20% para  $\Phi_{SC}$ . Sin embargo, en la estructura B, que considera a la población de Tilgo como un grupo aislado, se registró el mayor porcentaje (23,79) de variación entre grupos y un  $\Phi_{CT}$  de 0,237, con un valor de *P* no significativo. Ello indica que el mayor porcentaje de la varianza sería aportado por la población de Tilgo.

## VII.2.F. Historia demográfica

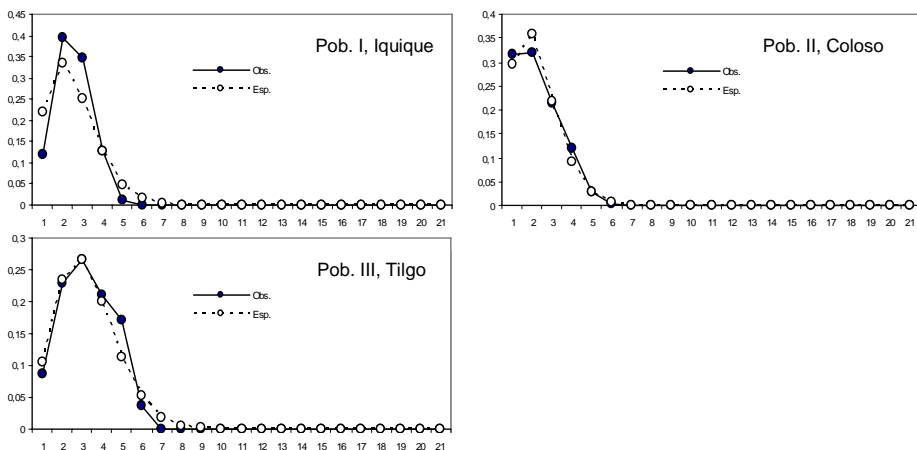
Las distribuciones de diferencias presentadas por las poblaciones de esta especie son unimodales aunque existen diferencias entre ellas. Los estimadores más sensibles como  $F_s$  y  $R_2$ , para la detección de la expansión poblacional, son significativos, apoyando la situación de expansión para las poblaciones de Iquique y Tilgo. Para la población de Tilgo el valor de  $R_2$  no es significativo, aunque la distribución es ajustable a la esperada bajo el modelo de expansión súbita (Tabla 30).

**Tabla 30. Parámetros estimados para las poblaciones de *Fissurella limbata*.**

Población	$\tau$	$\Theta_0$	$\Theta_1$	MAE	H Ri	Tajima D	Fu $F_s$	$R_2$
I, Iquique	1,515	0	1000	0,7902	0,1382	-1,5266	-7,288***	0,0658***
II, Coloso	1,05	0,183	1000	0,3859	0,0292	-1,6377	-5,089***	0,0717**
III, Tilgo	2,267	0	1000	0,6863	0,0458	-0,2899	-3,937**	0,1216

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

La población de Coloso muestra el menor valor de  $\tau$ , que es duplicado en el caso de la población de Tilgo, la cual presenta una clara distribución más desplazada hacia la derecha, que la de las otras poblaciones (Figura 35).



**Figura 35. Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de *F. limbata*.**

### VII.3. Estructura genética poblacional de *Fissurella latimarginata*-*Fissurella cumingi*

Se obtuvieron 129 secuencias provenientes del segmento ND1 (ARNt-Leu-ND1), de especímenes pertenecientes a seis áreas de muestreo del complejo *F. latimarginata*-*F. cumingi*, localizadas entre la Provincia Peruana y la Magallánica. Hasta el trabajo de McLean (1984), estas dos especies han sido históricamente una única especie, representando *F. cumingi* una variedad de *F. latimarginata*.

#### VII.3.A. Variabilidad genética en las secuencias ND1

Las secuencias obtenidas para el complejo *F. latimarginata*-*F. cumingi*, no poseen sitios nucleotídicos con inserciones ni deleciones. No obstante, presentan sitios con sustituciones de bases, que mayoritariamente corresponden a transiciones.

El número de transiciones es variable entre las seis poblaciones analizadas, en tanto que el de transversión frecuentemente es 1, fluctuando entre 0-2 (Tabla 31). Para este complejo de especies que incluye un total de 129 individuos, el valor de  $\pi$  es de 0,0035 y el de  $h$  es 0,636.

**Tabla 31. Estructura genética en el complejo de poblaciones de *F. latimarginata*-*F. cumingi* que habitan en seis localidades.**

Población	n	hap	sp	ts	tv	$\pi$	$h$
Iquique	29	10	13	12	1	0,00411 $\pm$ 0,00274	0,5764 $\pm$ 0,1093
Coloso	29	9	11	10	1	0,00671 $\pm$ 0,00407	0,7340 $\pm$ 0,0740
Tilgo	28	12	14	13	1	0,00699 $\pm$ 0,00420	0,7513 $\pm$ 0,0865
LIA	20	4	4	3	1	0,00189 $\pm$ 0,00159	0,2842 $\pm$ 0,1284
A. Co.	14	4	5	5	0	0,00169 $\pm$ 0,00151	0,3956 $\pm$ 0,1588
Polocue	9	8	13	11	2	0,01300 $\pm$ 0,00783	0,9722 $\pm$ 0,0640

hap: número de haplotipos; sp: sitios polimórficos; ts: número de transiciones; tv: número de transversiones;  $\pi$ : diversidad de nucleótidos;  $h$ : diversidad de haplotipos. LIA: La Isla de Algarrobo; A. Co.: Arco Cocholgue.

En las poblaciones de La Isla de Algarrobo (LIA) y Arco Cocholgue (A. Co.) existen los menores números de sitios polimórficos y también se registran las menores diversidades nucleotídicas; en tanto que en Polocue y Tilgo, poseedoras de los mayores sitios polimórficos, se verifican las mayores diversidades de nucleótidos. Similarmente, la diversidad de haplotipos es mayor en la población de Polocue y menor en la La Isla de Algarrobo (Tabla 32).

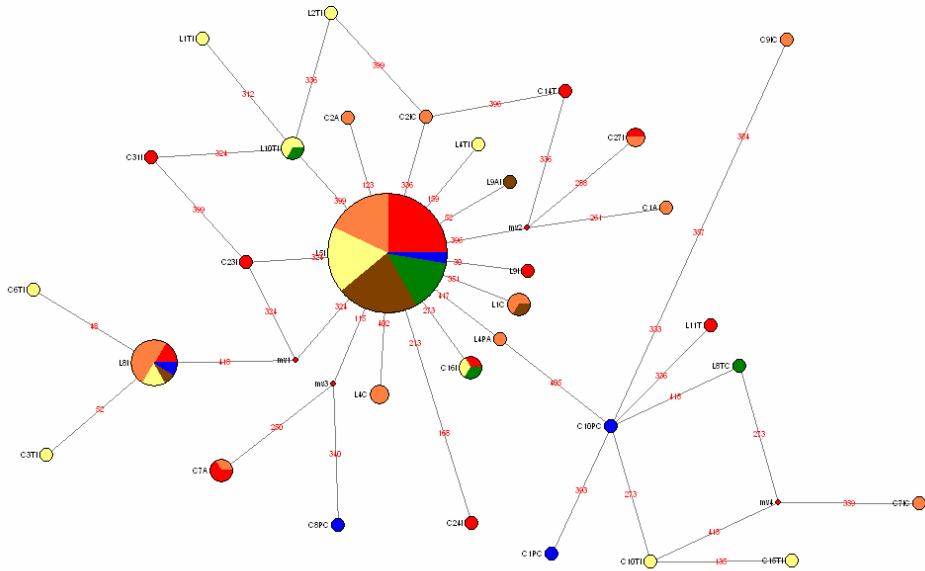
Las seis poblaciones del complejo *F. latimarginata*-*F. cumingi*, poseen 32 haplotipos, de los cuales solamente uno (hap. 1) está presente en todas las poblaciones con alta frecuencia relativa que fluctúa entre 0,48 – 0,95; excepto en la de Polocue que muestra un 0,22. En esta población, se registra la mayor exclusividad de haplotipos representada por seis tipos diferentes con una frecuencia relativa total de 0,66. Aunque en la de Iquique también hay seis haplotipos exclusivos, la frecuencia relativa de ellos es de 0,18. Las variaciones de las frecuencias absolutas y las relativas de los distintos haplotipos, en las diferentes poblaciones analizadas, aparecen detalladas en la Tabla 32.

**Tabla 32. Frecuencia de haplotipos en poblaciones de *F. latimarginata*-*F. cumingi*. Hap: Haplotipos; Fa: Frecuencia absoluta; Fr: Frecuencia relativa, LIA: La Isla de Algarrobo; A. Co.: Arco Cocholgue**

	Iquique (n=29)		Coloso (n=29)		Tilgo (n=28)		LIA (n=20)		A. Co. (n=14)		Polocue (n=9)	
Hap	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
1	19	0,66	14	0,48	14	0,5	17	0,85	11	0,79	2	0,22
2	2	0,07	6	0,21	2	0,07	1	0,05	0	0	1	0,11
3	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1	0,03	0	0	1	0,04	0	0	1	0,07	0	0
6	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	1	0,03	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
9	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	2	0,07	0	0	1	0,05	0	0	0	0
12	0	0	2	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	1	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	1	0,03	2	0,07	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	2	0,07	0	0	1	0,07	0	0
21	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	1	0,04	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	1	0,05	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,07	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11



### VII.3.B. Relaciones entre los haplotipos de *F. latimarginata*-*F. cumingi*.



**Figura 36.** Entramado de haplotipos de la secuencia ND1, obtenidos para las especies *F. latimarginata*-*F. cumingi*, basado en el algoritmo “median-joining”. Cada círculo indica un haplotipo y su área es proporcional a la frecuencia absoluta de haplotipos. La fracción de cada círculo indica el número de haplotipos presente en las poblaciones estudiadas mediante el código de color: ● Iquique, ● Coloso, ● Tilgo, ● La Isla de Algarrobo, ● Arco Cocholgue, ● Polocue.

La mayoría de los individuos (60%) de este juego combinado de las especies *F. latimarginata* y *F. cumingi*, pertenecientes al denominado “complejo latimarginata”, presenta un único haplotipo común. Ello está en concordancia con la agrupación de ambas especies morfológicas en un único grupo para su análisis poblacional. Dicho haplotipo presenta una posición central, derivando de él un gran número de haplotipos con bajas frecuencias y encontrándose representado en todas las poblaciones en similar proporción (Figura 36).

### VII.3.C. Análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos

Las frecuencias haplotípicas en cada una de las seis poblaciones muestreadas, presentan una heterogeneidad geográfica, una o varias poblaciones muestran frecuencias significativamente distintas ( $P = 0,01$ ).

### VII.3.D. Análisis de los estadísticos poblacionales

**Tabla 33.** Matriz de estimaciones de  $F_{ST}$  entre seis poblaciones de *F. latimarginata*-*F. cumingi*. Encima de la diagonal se indican las estimaciones de  $Nm$  a partir de estimaciones de  $F_{ST}$  linearizados.

Población	Iquique	Coloso	Tilgo	LIA	A. Co.	Polocue
Iquique	-	-	33,35	inf	inf	2,90
Coloso	0,01477	-	395,31	16,71	11,81	3,37
Tilgo	0,00072	0,00414	-	32,16	inf	6,06
LIA	-0,01121	0,02904	0,01531	-	inf	1,83
A. Co.	-0,01937	0,04062	-0,01277	-0,00820	-	3,93
Polocue	0,14689**	0,12926**	0,07618*	0,21436**	0,11289*	-

LIA: La Isla de Algarrobo; A. Co.: Arco Cocholgue. \*  $P < 0,05$  ; \*\*  $P < 0,01$  (1023 permutaciones)

Se observan valores significativos de  $F_{ST}$  únicamente entre la población de Polocue y el resto de las poblaciones (Tabla 33). Sin embargo, es necesario tener en cuenta la diferencia entre el tamaño poblacional de la muestra de Polocue ( $N=9$ ) sensiblemente inferior al del resto de poblaciones.

### VII.3.E. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

En las distintas permutaciones de grupos realizadas, definidas como estructura A, B y C mediante AMOVA se pudo estimar que las variaciones de los valores del estadístico  $\Phi_{SC}$  no fueron significativas, resultado indicativo de ausencia de diferenciaciones genéticas entre las poblaciones en el interior de los grupos considerados.

**Tabla 34. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis poblaciones de *F.latimarginata*-*F.cunningi* en base a las secuencias mitocondriales del gen ND1.**

Fuente de Variación	Varianza de componentes		% variación	Estadístico $\Phi$	$P$
<b>Estructura A</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	0,04157	3,56	$\Phi_{CT} = 0,03561$	0,17986
Entre poblaciones dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,00068	0,06	$\Phi_{SC} = 0,00060$	0,22385
En la población	$\sigma^2_c$	1,12530	96,38	$\Phi_{ST} = 0,03619$	0,05181
<b>Estructura B</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	0,05904	5,05	$\Phi_{CT} = 0,05045$	0,03617
Entre poblaciones dentro de grupos	$\sigma^2_b$	-0,01414	-1,21	$\Phi_{SC} = -0,01272$	0,35973
En la población	$\sigma^2_c$	1,12530	96,16	$\Phi_{ST} = 0,03837$	0,04594
<b>Estructura C</b>					
Entre grupos	$\sigma^2_a$	0,01966	1,69	$\Phi_{CT} = 0,01688$	0,21505
Entre poblaciones dentro de grupos	$\sigma^2_b$	0,01977	1,70	$\Phi_{SC} = 0,01726$	0,16716
En la población	$\sigma^2_c$	1,12530	96,62	$\Phi_{ST} = 0,03385$	0,04008
<b>Estructura</b>					
<b>A:</b> 4 grupos (Iquique-Coloso), (Tilgo), (Arco Cocholgue-La Isla de Algarrobo), (Polocue)					
<b>B:</b> 4 grupos (Iquique), (Tilgo-Coloso), (Arco Cocholgue-La Isla de Algarrobo), (Polocue)					
<b>C:</b> 4 grupos (Iquique-Coloso), (Tilgo-La Isla de Algarrobo), (Arco Cocholgue), (Polocue)					

Entre los grupos se constató el mayor y significativo porcentaje de variación (5%) en la estructura B, reflejado en el valor del estadístico  $\Phi_{CT}$ . El valor estimado del porcentaje de variación dentro de las poblaciones fue superior al 96% para las tres organizaciones de grupos (Tabla 34).

En las permutaciones realizadas, la población de Polocue siempre se mantuvo independiente y su impacto a nivel de variación entre grupos se manifestó en la estructura B, al considerar como independientes los dos grupos de poblaciones situadas en los extremos de sus distribuciones en la costa.

## VII.3.F. Historia demográfica

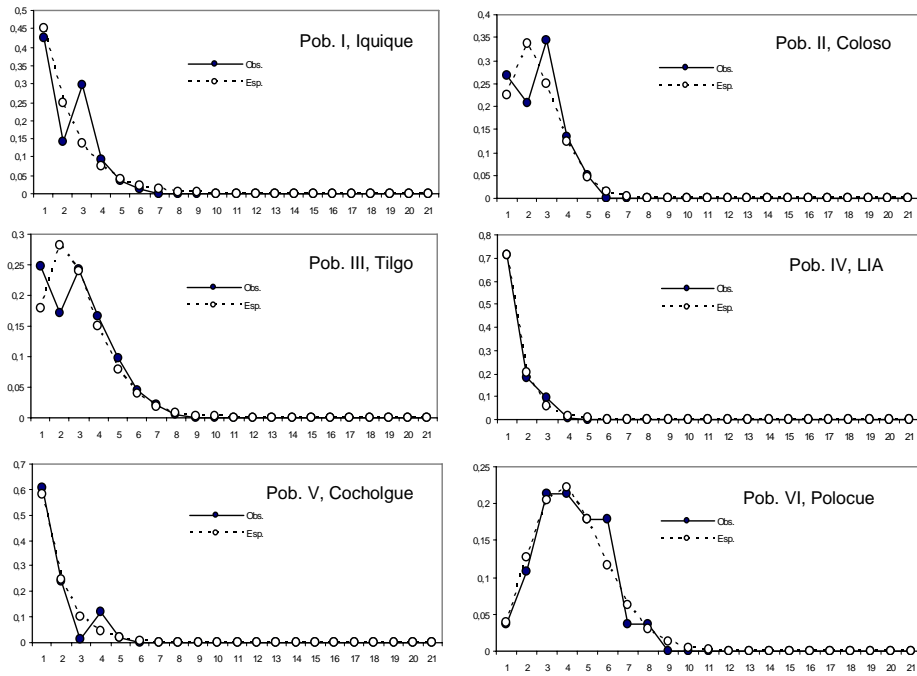
Tabla 35. Parámetros estimados para las poblaciones de *F. latimarginata*-*F. cumingi*.

Población	$\tau$	$\Theta_0$	$\Theta_1$	MAE	H Ri	Tajima D	Fu Fs	$R_2$
I, Iquique <sup>a</sup>	0,619 <sup>a</sup>		inf	0,3541	0,1478	-2,1134*	-5,903**	0,0556***
II, Coloso	1,493	0	1000	0,4957	0,0768	-1,5145	-3,491*	0,0658**
III, Tilgo	1,124	0,815	1000	0,4002	0,0253	-1,5608	-6,019***	0,0614**
IV, LIA <sup>a</sup>	0,091	0,309	inf.	0,0759	0,3025	-1,8679*	-2,074*	0,1275
V, A. Co.	0	0,717	Inf.	0,1995	0,2071	-1,8893*	-1,151	0,1623
VI, Polocue	3,722	0	1000	0,7466	0,0316*	-1,0583	-3,611*	0,0958**

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ . <sup>a</sup> Valor esperado para un tamaño constante

Existe una variedad de distribuciones para las poblaciones estudiadas del complejo *F. latimarginata*-*F. cumingi*, reflejando diferencias en la historia demográfica de las poblaciones analizadas. La población de Iquique a pesar de no ajustarse a la distribución esperada bajo un modelo de expansión, sí presenta valores de  $F_s$  y  $R_2$ , indicadores de un evento de expansión. De forma similar la población de LIA solo presenta un valor significativo para  $F_s$  (Tabla 35).

Las distribuciones observadas para LIA y A. Co. son muy similares entre ellas y diferenciadas del resto. Sus valores de  $\tau$  son próximos a 0, siendo similares las distribuciones tanto bajo modelos de expansión como de tamaño constante. Para estas poblaciones el episodio de expansión poblacional es muy reciente. En la población de Polocue se observa el mayor valor de  $\tau$ , esperable para esta población que muestra un mayor tiempo de coalescencia de sus haplotipos y una mayor antigüedad del evento expansivo (Figura 37).



**Figura 37.** Distribución de las diferencias entre pares de secuencias (“mismatch distribution”) para cada una de las poblaciones analizadas de las especies consideradas (*F. latimarginata* y *F. cumingi*) del “complejo latimarginata”.



## DISCUSIÓN







## **I. Relaciones filogenéticas consensuadas**

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, basada en los genes nucleares H3, ITS1 e ITS2; mitocondriales CYTB, ND1 y ARNr 16S y datos de RAPDs, ha mostrado áreas de las topologías muy consensuadas, mientras que se han observado otras variables, dependientes de los genes considerados y de la metodología utilizada.

Tras el análisis filogenético de las especies consideradas, los fisurélidos del Pacífico Sudoriental se agrupan monofiléticamente, respecto a las especies divergentes del Atlántico (*F. nimbosa* del Atlántico Oeste y *F. schrammii* del Atlántico Este).

En la zona más basal de las topologías las relaciones pueden consensuarse como una politomía, involucrando los clados I y II, además de las especies *F. crassa* y *F. nigra* (Figura 38). Esta politomía se justifica en los generalmente escasos valores de replicación y en las posiciones alternativas de dichos taxa en topologías estimadas con metodologías alternativas. Sin embargo, *F. crassa* aparece más frecuentemente como la especie basal del grupo I, mientras que *F. nigra* se asocia, generalmente al grupo II.

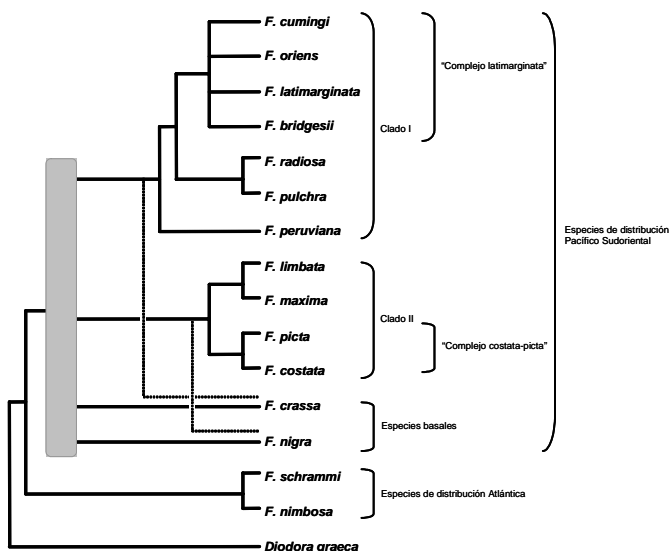
La escasa resolución de las relaciones en la zona basal de los árboles filogenéticos no es debida a la dinámica mutacional de las secuencias analizadas, ya que genes con tasas diversas como el CYTB o ND1 y el más conservado ARNr 16S o nucleares, presentan las mismas dificultades. Por ello, y tal y como muestran las escasas distancias en los nodos basales, es fruto de eventos de especiación simultáneos o muy próximos en el tiempo.

El clado I contiene como especie basal a *F. peruviana*, situándose como especies hermanas, íntimamente relacionadas, *F. radiosa* y *F. pulchra*,

aunque siendo situadas en grupos diferentes de especies en base a caracteres morfológicos (McLean, 1984). Dentro de este grupo se observa, en la posición más externa, un clado en politomía conteniendo las especies morfológicamente caracterizadas como *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*.

El consensuado clado II, tiene a su vez dos clados. El primero de ellos contiene a las dos especies hermanas *F. limbata* y *F. maxima*, mientras que el segundo contiene una politomía que implica a los especímenes de *F. picta* y *F. costata*, en congruencia con su discutida posición taxonómica.

Estos grupos politómicos son tratados aquí al margen de cualquier revisión taxonómica, de una forma meramente descriptiva, siendo considerados como “complejo latimarginata” y “complejo costata-picta”. Aunque el consenso sobre esta situación proviene de marcadores independientes mitocondriales y nucleares, es requerida una revisión de los caracteres morfológicos, biología y ecología de los taxa implicados, para el planteamiento de una revisión de su taxonomía.



**Figura 38.** Árbol filogenético consenso de las diversas topologías obtenidas con los distintos juegos de datos evaluados con metodologías alternativas.

## II. Clasificación taxonómica actual y filogenia molecular

### II.1. Organización taxonómica a nivel de subgéneros

El presente estudio sobre filogenia molecular consideró todas las especies de lapas reconocidas por sus características morfológicas, para la provincia faunística peruviana y magallánica del Pacífico Sudoriental y ubicadas taxonómicamente en el subgénero *Fissurella* Bruguière, 1789 “*sensu stricto*”. Junto a este subgénero se reconoce el subgénero *Cremides* H. y A. Adams, 1854. El subgénero *Fissurella* se caracteriza por presentar una concha con dos capas, una externa compuesta de calcita y una interna de aragonita, mientras que en el subgénero *Cremides*, su concha está compuesta exclusivamente de aragonita (McLean, 1984).

Las reconstrucciones de árboles de filogenia en base a diferentes genes mitocondriales y nucleares, simples o combinados, permiten establecer el estatus de monofilia de las especies de lapas de Chile consideradas en el subgénero *Fissurella*. Este clado monofilético no incluye a la especie del Atlántico *F. nimbosea*, la cual también es validada por McLean (1984) como miembro del subgénero *Fissurella*. Sin embargo, *F. nimbosea*, forma un clado hermano del clado *F. schrammii* del Atlántico Oriental, especie tropical del subgénero *Cremides* H. y A. Adams, 1854 (McLean, 1984). Las relaciones entre estas dos especies atlánticas, en base a distintos marcadores moleculares, son incongruentes con aquella sustentada en la estructura macroscópica de la concha que las ubica en subgéneros diferentes, por lo cual sería pertinente reconsiderar el valor taxonómico atribuido a la capa externa e interna de la concha de los animales del género *Fissurella*.

Por lo tanto, la clasificación sustentada en la división del género *Fissurella*, en los subgéneros *Fissurella* y *Cremides*, no tiene justificación a la luz de los datos moleculares evaluados. Por el contrario, las distancias genéticas y las topologías obtenidas de los genes mitocondriales y nucleares

permiten establecer dos clados monofiléticos de *Fissurella*: uno formado por especies del Atlántico y otro correspondiente a las especies del Pacífico Sudoriental.

## II.2. Grupos de especies de *Fissurella*

En el clado del Pacífico Sudoriental, las dos agrupaciones, I y II, de especies, no muestran congruencia con los grupos *F. peruviana*, *F. maxima* y *F. limbata* definidos por McLean (1984), en base al grosor relativo de las capas de aragonita y calcita y a la complejidad de la escultura radial y secundarias.

En el grupo de *F. peruviana*, con una capa de aragonita tan gruesa como la de calcita, se incluiría a *F. nimbosea*, pero la gran divergencia observada entre ambas especies y las topologías estimadas, no indican un agrupamiento monofilético de ambas especies, el cual justificaría su agrupación.

Adicionalmente, el grupo I, comprende especies del grupo de *F. maxima* (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. radiosa*) y del grupo *F. limbata* (*F. pulchra* y *F. bridgesii*). Del mismo modo, el grupo II, incluye especies del grupo *F. maxima* (*F. maxima*, *F. costata* y *F. picta*) y del grupo *F. limbata* (*F. limbata*). Esta situación, nuevamente resalta la inconsistencia en considerar la estructura de la concha para establecer relaciones y agrupaciones entre especies de *Fissurella*. A la vez, evidencia que la metodología molecular no siempre es congruente con la morfológica, como ha sido previamente constatado en otros estudios (Avise, 1994; Schiaparelli *et al.* 2005).

Por otra parte, los dos grupos de especies no muestran concordancia con su distribución geográfica, descrita para las provincias faunísticas malacológicas de la región (McLean, 1984) y, por el contrario, engloban especies de ambas provincias. Así el grupo I, incluye las especies de la provincia Peruana: *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. bridgesii*, *F. pulchra* y

*F. peruviana* y las de la provincia Magallánica: *F. oriens* y *F. radiosa*; mientras que en el grupo II, se asocian las especies *F. maxima*, *F. limbata* y *F. costata* de la provincia Peruana, y las de la Magallánica *F. picta* y *F. nigra*; pero *F. nigra* puede también estar asociada con especies del grupo I.

Del mismo modo, tampoco las especies muestran relaciones de asociación con la zonación vertical del área litoral en la que habitan (McLean, 1984; Bretos, 1980b) encontrándose que las estrictamente intermareales *F. crassa* se localiza en el grupo I y es hermana del conjunto de especies de este grupo, mientras que *F. limbata* y *F. picta* en el grupo II. Las restantes 10 especies que comparten su ciclo vital entre el hábitat intermareal-submareal, se distribuyen en asociaciones ya sea en el Grupo I o en el II. Lo anteriormente descrito, evidencia que las asociaciones de las especies del subgénero *Fissurella* de Chile, realizadas en base a datos moleculares, no se relacionan con las características ambientales de las regiones faunísticas ni con los microambientes zonales verticales de la región costera del litoral Pacífico Sudoriental.

La falta de concordancia entre los patrones taxonómicos planteados, en base a características de composición y estructura de la concha, y las relaciones filogenéticas estimadas a partir de los datos moleculares, se debe a dificultades inherentes a los caracteres morfológicos utilizados.

La clasificación en subgéneros y la agrupación de especies en base a la presencia relativa de las capas de calcita y aragonita, y caracteres asociados de la concha, muestra las dificultades originadas por tales caracteres. Aunque McLean (1984) recurre al uso sistemático de dichas características, también indica la dependencia de esos caracteres del medio ambiente. La mayoría de los fisurélidos, entre ellos las especies tropicales, presentan una única capa de aragonita, mientras que las especies de la costa chilena presentan la capa externa calcítica y la interna aragonítica. Sin embargo, la deposición relativa de

calcita y aragonita es un proceso dependiente de la temperatura. Así, en especies de *Mytilus* y *Littorina* la deposición de calcita incrementa con la latitud (Lowenstam, 1954) y específicamente dentro del género *Fissurella*, la especie *F. picta* del Estrecho de Magallanes (53° 37' S) presenta una capa aragonítica sensiblemente más fina que especímenes recolectados a 42° 42' S (McLean, 1984).

La variabilidad medioambiental de la relación calcita-aragonita, no sólo afecta a tal carácter, sino que probablemente afecta a caracteres relacionados y de uso en la sistemática tradicional de este género, tales como la estructura radial de las costillas, su complejidad y coloración.

### II.3. Congruencia entre especie morfológica y filogenética en *Fissurella*

Los análisis de divergencia genética y la reconstrucción de las relaciones filogenéticas realizados con secuencias provenientes de las 13 especies, tipológicamente y taxonómicamente reconocidas, permitieron establecer 9 unidades filogenéticas para el subgénero *Fissurella*.

De ellas, 7 muestran coincidencia de identidad entre las definiciones en base a caracteres morfológicos dados por McLean (1984) y las que cumplen con los atributos filogenéticos de especie (Cracraft, 1983; Avise, 1994). Estas especies son: *F. crassa*, *F. nigra*, *F. maxima*, *F. limbata*, *F. peruviana*, *F. pulchra* y *F. radiosa*.

En contradicción, las otras seis especies muestran incongruencia entre la nomenclatura taxonómica y filogenética molecular, lo cual quedó reflejado en el establecimiento de dos grupos de especies filogenéticas: el complejo *latimarginata* formado por las especies morfológicas *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. bridgesii* y *F. oriens* y el complejo *F. costata* – *F. picta*. Estas diferencias, tienen su origen en las variaciones morfológicas entre los

individuos con la generación histórica de más de un nombre para la misma especie (McLean, 1984; Ramírez-Boehme, 1974; Marincovich, 1973; Pérez-Farfante, 1952). Aunque, McLean (1984), definió una serie de caracteres de valor taxonómico para las especies, con frecuencia ejemplares divergentes del holotipo descrito, de especies diferentes, comparten atributos morfológicos siendo difícil asignarlos a una determinada especie (Vegas, 1968; Guzmán *et al.*, 1998; Olivares *et al.* 2006). Previamente *F. cumingi* fue considerada una variedad de color de *F. latimarginata* y ambas especies comparten aspectos morfológicos de la concha y, en algunas variantes individuales, se encuentra un patrón de rayos muy similar. Del mismo modo, el diseño de la concha puede ser confundido entre *F. latimarginata* y *F. bridgesii*, y el de esta especie con *F. oriens*.

De igual manera en el complejo de especies “costata – picta” los especímenes comparten una semejante morfología de concha y otros caracteres de la misma incluidos la coloración, aspecto de los rayos, grosor y amplitud de las costillas, a menudo muestran una amplia variabilidad entre animales, siendo difícil la asignación específica. Para *F. picta* se reconocen dos subespecies y los ejemplares considerados en este estudio corresponden a los del área de *F. picta lata*, desconociéndose si la subespecie *F. picta picta*, del área de Magallanes podría ser parte de este complejo.

Es posible que las diferencias morfológicas existentes en estas especies sean una consecuencia de las características específicas del medio en que viven, las cuales varían desde el intermareal rocoso rodeado de arena en que se encuentra *F. bridgesii*, al intermareal rocoso abierto y submareal de las otras especies. Las variaciones de las condiciones ambientales, han sido mencionadas como responsables de significativas diferenciaciones fenotípicas entre las poblaciones que viven en medios intermareales heterogéneos (Sokolova & Boulding, 2004), lo cual ha sido constatado en el gasterópodo

*Scurria parasitica*, un epibionte de *Fissurella* y de otros invertebrados marinos, que presenta morfología variable según el medio en que habita, pero todos los morfotipos distintos poseen el mismo haplotipo mitocondrial (Espoz *et al.* 2004). Un caso extremo de la plasticidad morfológica en gasterópodos lo evidencian *Lymnaea peregra* y *L. ovata*, las cuales viven en hábitats diferentes y difieren en características de la concha, pero en similares condiciones de laboratorio convergen en morfología de la concha al cabo de dos generaciones (Wulschleger & Jokela, 2001).

### III. Estructura genética poblacional

#### III.1. Análisis comparativo de los valores de diversidad e historia demográfica

El análisis comparativo de los valores de diversidad genética en las especies *F. limbata*, *F. crassa* y el “complejo latimarginata” (incluyendo en este complejo los especímenes clasificados morfológicamente como *F. latimarginata* y *F. cumingi*), permite observar patrones significativos.

Las especies *F. limbata* y *F. crassa* comparten rasgos morfológicos y ocupan hábitats similares, siendo abundantes a lo largo de su distribución, aunque no son observables individuos de gran talla, debido a la accesibilidad de su hábitat tanto para la explotación como para la predación. Sin embargo, existen diferencias de importancia en su distribución vertical dentro del rango intermareal. Así, *F. limbata* ocupa desde la zona intermedia a la baja intermareal, mientras que *F. crassa* ocupa la zona intermedia e incluso zonas superiores. La denominación popular refleja dicha selección específica del hábitat. La especie *F. limbata* es conocida como “lapa gaviota” en Iquique debido a la depredación por esas aves durante la marea baja, mientras que *F. crassa* es denominada “lapa de sol” debido a su exposición al sol, por



ocupar con frecuencia y en cantidad hábitats en el rango superior del intermareal (Bretos, 1980a; McLean, 1984).

Estas diferencias en el rango de ocupación del área intermareal, probablemente afectan a los valores de diversidad genética y a los parámetros demográficos estimados para cada especie.

Los valores de diversidad genética ( $\pi$  y  $h$ ) son superiores en *F. limbata* respecto a los de *F. crassa*. El valor de  $\pi$  de *F. limbata* duplica al de *F. crassa*, y el de  $h$  es claramente superior en la primera especie. Esta situación tiene su reflejo en los entramados de haplotipos estimados para ambas especies. Así el calculado para *F. crassa* presenta una diversidad mucho más pobre y una estructura más simple, aunque similar, que el de *F. limbata*.

Las dos especies presentan similares distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias, para cada una de las tres áreas de muestreo (I, Iquique; II, Coloso; III, Tilgo), comunes para las dos especies. Sin embargo, los valores de  $\tau$  son inferiores para *F. crassa*, indicando una menor antigüedad para esas poblaciones de esta especie respecto a los mayores valores de *F. limbata*.

El tercer taxón analizado (combinación de *F. latimarginata* y *F. cumingi*), ocupa el nivel más bajo del gradiente intermareal, siendo considerado como submareal (McLean, 1984; Olivares *et al.* 1998). Sus niveles de  $\pi$  y  $h$  son comparables a los estimados para *F. crassa*. Sin embargo, el entramado de las relaciones entre sus haplotipos es mucho más complejo que en las especies anteriores.

Es difícil establecer la relación entre los valores de datación de la coalescencia de las poblaciones ( $\tau$ ) y los valores de diversidad genética, con la sensibilidad diferencial a variaciones climáticas, a la explotación humana y a la predación natural.

El mayor valor de  $\tau$  (3,722) se obtiene para la población de Polocue en el “complejo latimarginata-cumingi”. Teniendo en cuenta que  $T = \tau/(2u)$ , siendo  $u$ , la tasa de mutación por secuencia y por generación,  $u = 2,22 \cdot 10^{-5}$ , se obtiene una antigüedad para dicha población datada en los 168.000 años. Estos especímenes submareales, y por lo tanto escasamente expuestos a predación y explotación, se localizarían en la pesquería de la X región, que muestra un nivel medio de extracción, pero correspondiente a *F. picta* y *F. nigra* en su mayoría. En contraste, para este mismo taxón, las muestras de las poblaciones IV y V, presentan unos valores de  $\tau$  igual o cercano a 0, en las zonas donde existe una mediana captura de lapas (Regiones V y VII). Estas poblaciones podrían corresponder a recientes colonizaciones. Por ello, junto con el conocimiento del nivel de explotación de un recurso, es necesario identificar a nivel de especie tales capturas y conocer el nivel del tamaño poblacional de la especie considerada.

Otro ejemplo de potenciales factores involucrados sería que, junto con una mayor protección frente a explotación y predación, esperable para especies del hábitat submareal (como *F. latimarginata* y *F. cumingi*), se debe tener en cuenta su mayor sensibilidad a variaciones en el nivel del mar, no de tipo climático sino catastrófico, en un área tan proclive a movimientos de placas tectónicas.

La datación de la coalescencia a partir de los valores de  $\tau$  estimados para *F. crassa*, *F. limbata* y otras poblaciones del “complejo latimarginata-cumingi” presenta un valor medio de 52.900 años.

### III.2. Estructura genética

La presencia de la corriente costera de Humboldt a lo largo de las áreas de distribución de las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, y la amplia disponibilidad de hábitats apropiados para la fijación y asentamiento

larvario, son factores que promueven el flujo génico entre poblaciones tendente a su homogeneización. En contraste, la escasa duración de la etapa larvaria y sus limitaciones nutritivas, limitarían tal flujo.

El análisis de la heterogeneidad geográfica de los haplotipos detecta diferenciación poblacional, implicando a la población de Tilgo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la sensibilidad de esta estimación al tamaño poblacional. Sólo un valor de  $F_{ST}$  es significativo para la población de *F. limbata* de Tilgo y para la del “complejo latimarginata-cumingi” de Polocue, la de mayor latitud y con un escaso tamaño muestral.

Los análisis AMOVA sólo detectan un valor  $\Phi_{CT}$  para el “complejo latimarginata-cumingi”, diferenciándose significativamente los grupos elaborados conteniendo a Iquique, Tilgo y Coloso, Arco Cocholgue y La Isla, y Polocue. En ningún otro caso fueron observados valores significativos.

Las estimaciones indican una ausencia de aislamiento genético significativo entre las áreas muestreadas de la especie consideradas y basado en el análisis de secuencias mitocondriales del gen ND1. Ello indicaría que el flujo larvario, a lo largo de un hábitat continuo, es suficiente para mantener una homogeneidad genética. No sería descartable la detección de algún grado de aislamiento con marcadores altamente resolutivos como microsátélites e incorporando poblaciones de latitudes más altas.

El nivel de flujo génico estimado tiene implicaciones para la gestión de sistemas de explotación de este recurso. Las poblaciones locales difícilmente sufrirían un colapso si son susceptibles de ser colonizadas mediante flujo larvario natural o repobladas sin conllevar pérdida de variabilidad genética.

#### **IV. Autenticación de especies**

Este estudio ha permitido diseñar la primera metodología específica que permite la autenticación de las lapas del subgénero *Fissurella* presentes

en la costa del Pacífico Sudoriental, en base a la secuencia del gen mitocondrial que codifica para citocromo b. Específicamente, la amplificación del fragmento de 410 pb del CYTB, posee la variabilidad nucleotídica interespecífica suficiente para el desarrollo de una metodología de PCR-RFLP para la autenticación de especies de lapas, usando enzimas de restricción específicas.

Las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III detectan varios sitios polimórficos específicos de cada especie analizada, dando lugar a la generación de patrones de restricción. Sin embargo, en concordancia con los análisis filogenéticos realizados en este estudio, se ha puesto de manifiesto la falta de diferenciación genética entre dos grupos de especies. Las especies del complejo latimarginata formado por *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesi*, constituyen un grupo polifilético, con una ausencia de divergencia genética entre ellas. De forma similar en el complejo costata-picta, las especies *F. picta* y *F. costata*, carecen de la variabilidad genética necesaria para ser diferenciables en base a las secuencias estudiadas. Para las otras especies de *Fissurella* las enzimas generaron fragmentos de restricción que producen un perfil electroforético característico y especie-específico, suficiente para permitir la adecuada autenticación de cada especie.

La selección de estas enzimas se ha llevado a cabo procurando la ausencia de sitios polimórficos intraespecíficos en las dianas, crítica para la identificación de las especies (Quinteiro *et al.* 1998), permitió la generación de patrones fácilmente diferenciables. Una ventaja adicional del método, radica en que el protocolo se puede llevar a cabo en una única reacción, ya que ambas enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III utilizan el buffer IV de NEB a la misma temperatura de incubación de 37 °C; aunque el uso exclusivo de BSA, en *Nla* III requiere un ajuste de las condiciones de reacción y una resolución elevada, preferentemente en geles de acrilamida, de los patrones más complejos fruto de la digestión combinada.

El producto de PCR, con un tamaño de 410 pb, es obtenible a partir de tejidos extraídos de productos frescos o congelados. Incluso estudios similares, en donde los tejidos han sido sometidos a un alto tratamiento térmico, el ADN ha sido extraído con la suficiente calidad para obtener el producto de PCR (Quinteiro *et al.*, 1998; Russel *et al.* 2000). Por ello, esta metodología es aplicable a la autenticación de toda la gama de presentación comercial de las lapas del género *Fissurella*. Esta metodología también es de aplicación en la identificación de individuos en cualquier estadio de su desarrollo ontogenético (huevos, embriones, larvas, semillas, estados de reciente asentamiento y juveniles) y podría ser de gran utilidad en estudios de biología básica, pesquera y ecología, así como trazabilidad de las especies del género *Fissurella*, durante la cadena de comercialización.

## **V. Filogeografía y origen geográfico del género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental**

El subgénero *Fissurella* en el litoral del Pacífico pudo haber emergido en base a tres hipotéticos escenarios: i) la relación entre los componentes del macrocontinente austral Gondwana, ii) colonización desde el Atlántico a través del límite sur continental, y iii) colonización desde el Atlántico a través del Istmo de Panamá.

### **V.1. Relación con el antiguo macrocontinente austral Gondwana.**

El continente sudamericano posee una biota de origen híbrido, en la que resalta la estrecha relación del extremo Sur de Sudamérica con Australia, Tasmania, Nueva Guinea, Nueva Caledonia y Nueva Zelanda, reflejando la existencia de una biota ancestral austral (Crisci *et al.* 1991), en estrecha concordancia con la pasada existencia del gran supercontinente Gondwana

(Triasico), del cual además formaba parte el continente antártico. La fragmentación de Gondwana, desagregación y deriva de sus áreas, produjeron la extinción y separación de numerosas especies, la divergencia y especiación de ellas en los nuevos hábitats de los distintos territorios geográficos generados, al término del Cretácico e inicio del período Terciario (Sacchi, 2002; Stilwell, 2003).

La falta de información paleontológica y paleoceanográfica limita el análisis de los procesos biogeográficos vicariantes, aunque la afinidad taxonómica de muchos taxa de invertebrados marinos chilenos (entre ellos moluscos, equinodermos y briozoos), con las costas del hemisferio sur es evidente (Camus, 2001). De igual modo, existe una alta similitud entre las algas marinas chilenas con las de Australia, Nueva Zelanda, Tasmania y la Antártida (Santelices, 1989).

En lo específicamente relacionado con Fissurellidae, registros paleontológicos del Paleoceno muestran la existencia de las especies *Emarginula* sp., *Rimula crepiduloides* y *Puncturella (Altrix) caminata* en Australia y de *Emarginula* en la Islas Chatham; pero ningún fósil representante de la familia fue localizado en Nueva Zelanda, Antártida y la Patagonia (Stilwell, 2003). Estos géneros no habían sido registrados para Chile, pero recientemente se extrajeron dos ejemplares de *Puncturella conica* (D'Orbigny, 1841), en las aguas del sur de Chile desde una profundidad de 200 m (Osorio *et al.* 2006). Aunque este hallazgo es importante para asociar la deriva de los continentes, como fuente de origen para uno de los géneros de Fissurellidae en el Pacífico Sudoriental, no hay registros para relacionar los procesos vicariantes con la presencia de *Fissurella* en el margen rocoso costero de Chile.

Las conexiones entre el Pacífico Sudoccidental y el Sudoriental se remontan, en su límite más reciente, especialmente al Eoceno (Briggs, 1996),

sin que exista registro fósil de tal conexión para esta época. Además, para el Oligoceno se han descrito importantes descensos de temperatura y regresiones del nivel del mar, afectando de forma crítica a la diversidad de las especies marinas. En particular, a pesar de la globalidad de sus efectos, destacan las extinciones en áreas cercanas a la Antártica (Thomas, 1992) que afectarían de forma negativa a la fauna marina del litoral implicado.

El origen de la familia Fissurellidae es lo suficientemente reciente para no verse implicada en los eventos de tectónica de placa antes considerados. En la revisión de moluscos del Océano Austral, los primeros miembros de esta familia aparecen en tiempos recientes tras el Mioceno (Crame, 1996).

Se ha mencionado a la corriente de la deriva del oeste como un mecanismo fundamental para la dispersión y el establecimiento de la biota del sur, pero es poco probable que sea un mecanismo generalizado (Camus, 2001). Para algunas especies de equinoideos, se ha descrito un mecanismo de dispersión basado en la colonización secuencial de cordilleras y montes submarinos, entre Nueva Zelanda, Antártida e islas adyacentes. También se han señalado rutas de dispersión de los briozoos antárticos hacia el norte, usando las planicies abisales. Otros invertebrados como equinodermos, poliquetos, actinias y ascidias, pueden usar la submergencia como un modo de expandir su distribución, aprovechando su capacidad de organismos euribáticos (Camus, 2001). La utilización de la corriente de la deriva del oeste como vía de dispersión de *Fissurella* desde el Pacífico Sudoccidental para su establecimiento en las costas del Pacífico Sudoriental, se ve fuertemente limitada por la capacidad de sobrevivencia de la larva lecitotrófica, que agotaría sus reservas energéticas antes de establecer contacto con algún hábitat adecuado para asentarse y metamorfosear, que dependiendo de la temperatura del agua puede ocurrir entre 3 y 7 días, post-fecundación (Bahamondes-Rojas & Bretos, 2002; Pereira *et al.* 2006). Similarmente, los fondos abisales no son

apropiados para el asentamiento larval ni para el establecimiento de poblaciones de *Fissurella*, debido a que el ciclo de vida de las especies de *Fissurella* se desarrolla entre la zona intermareal y submareal alta del litoral rocoso, en la cual el ecosistema les ofrece las condiciones óptimas para las diferentes fases del desarrollo como sustrato, alimento, temperatura y salinidad (Bretos, 1988; López *et al.* 1999; 2003; Olguín & Jérez, 2003).

En consecuencia, tanto los datos paleontológicos como biológicos, descartarían la hipótesis de un origen austral para este género.

## **V.2. Origen atlántico y colonización del Pacífico por el extremo sur del continente Sudamericano**

Un cambio importante que afectó el modelo de circulación oceánica durante el Terciario inferior fue la apertura del pasaje de Drake, que separó el continente Antártico de Sudamérica permitiendo la conexión, por el extremo sur, del Océano Pacífico con el Atlántico y a la vez el establecimiento de la Circulación Circumpolar Antártica (CCA) (Camus, 2001). Aunque no hay coincidencia acerca del momento exacto en que ocurrió este evento geográfico, algunos estudios recientes lo ubican entre el límite Eoceno-Oligoceno (38 Ma) y Mioceno temprano, alrededor de 24 Ma (Hinojosa & Villagrán, 1997; Brown *et al.* 2006).

La historia paleogeográfica de la región condiciona que el eventual origen de las actuales especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental, desde un ancestro vía Atlántico por el extremo sur, podría haber ocurrido con posterioridad o al menos desde la época en que ambos océanos quedaron comunicados. No obstante, este evento de dispersión parece poco probable, considerando el desplazamiento de la corriente del Cabo de Hornos que fluye desde el Pacífico hacia el Atlántico. Por otra parte, no se puede descartar que el ancestral fisurélido, pudiera haber ingresado por zonas de aguas someras, antes



de la conexión total de los océanos. Estas zonas someras de comunicación pudieron haber existido entre puentes de tierra, que unían la Antártida con el continente sudamericano a través de la Tierra del Fuego (Camus, 2001). Los estudios paleoceanográficos, sobre foraminíferos planctónicos sugieren que aperturas de comunicación marina se produjeron alrededor de los 36 Ma, entre el límite Eoceno-Oligoceno (Crame, 1999)

Aunque la migración de organismos hubiera sido exitosa, la actual fauna magallánica chilena debería tener antepasados en la provincia magallánica en el sector atlántico. Sin embargo, en contradicción a lo anterior, en los registros fósiles de la provincia magallánica del Atlántico argentino no figuran miembros de la familia Fissurellidae y dejan en evidencia que la fauna previa a la apertura del paso de Drake corresponde a organismos que vivieron en aguas cálidas los cuales se extinguieron en su totalidad como consecuencia del ingreso de aguas frías desde el Cabo de Hornos o se retiraron hacia el norte, hacia las aguas más cálidas (Martínez & del Río, 2002a; 2002b). Los análisis de diversidad y distribución de géneros y especies de invertebrados marinos del Atlántico Suroeste, indican que los moluscos litorales de la costa del atlántico argentino se originaron en tiempos post-miocénicos; teniendo su origen en la provincia magallánica del Pacífico Sudoriental, después de establecida la corriente fría de las Malvinas, la cual proviene de una rama de la CCA (Martínez & del Río, 2002a; 2002b), y por la unión con la corriente del Cabo de Hornos (Camus, 2001).

Al igual que para la hipótesis anterior, los eventos considerados son muy anteriores a la datación en el registro fósil del género *Fissurella*, teniendo en cuenta la ausencia de esta familia en toda la región austral (Crame, 1996).

Además, las reconstrucciones filogenéticas de las especies de *Fissurella* de Chile, con secuencias de los genes mitocondriales CYTB; ND1 y ARNr 16S, revelan que *Fissurella radiosa*, habitante de la provincia

magallánica con una distribución desde 55° S hasta 42° S, es una de las especies de más reciente origen en relación a otras especies de *Fissurella* del Pacífico de la zona Sudoriental. Esta especie está íntimamente relacionada y es hermana de *F. pulchra*, la cual presenta una opuesta distribución (12° S-37° S). De las otras especies con una distribución por debajo de los 30° S, sólo *F. nigra* presenta una posición basal en las topologías. Las otras especies, *F. picta* y *F. oriens*, no pueden ser consideradas especies ancestrales, en especial ésta última.

Esta nueva evidencia de filogenia molecular no respalda el planteamiento del origen y especiación de *Fissurella*, desde el extremo sur del continente hacia el norte de la costa de Chile.

En ausencia de fósiles que permitan demostrar la pretérita existencia de algún antepasado de *Fissurella*, los actuales antecedentes sobre los eventos paleográficos, paleoceánicos y la reconstrucción realizada sobre la historia filogenética de *Fissurella*, no son adecuados para sustentar un eventual origen y radiación de las especies de *Fissurella* que habitan en el Pacífico Sudoriental desde el extremo sur del Atlántico.

### **V.3. Origen atlántico y colonización del Pacífico previa al elevamiento del Istmo de Panamá**

Las dificultades mostradas por las dos hipótesis previas indican como más plausible esta tercera hipótesis. No obstante, es necesario verificar detalladamente su concordancia con la totalidad de los datos disponibles, incluyendo los moleculares.

#### **V.3.A. Calibración molecular**

La calibración molecular de las secuencias de ADN obtenidas permite realizar dataciones de los eventos de especiación en la historia evolutiva del

género *Fissurella* en el Pacífico Sudoriental, incluyendo la elucidación de su origen. Ello es posible a través de la inferencia de la tasa de evolución molecular para la secuencia seleccionada, en este caso el citocromo b (CYTB). La selección de esta secuencia se basa en las numerosas calibraciones de este gen en una amplia variedad de organismos y a lo largo de variados intervalos de tiempo. Es posible así llevar a cabo comparaciones de tasas entre organismos próximos filogenéticamente (Avice, 2004).

La estimación aproximada de la tasa de evolución para el fragmento analizado del gen mitocondrial del CYTB es posible desde dos perspectivas: i. usando los datos del registro fósil y ii. a partir del evento vicariante asociado con la elevación del Istmo de Panamá.

El primer registro fósil de la familia Fissurellidae Fleming, 1989, se remonta a yacimientos datados en el Triásico Medio (Ladiniano) en Italia y con continuidad hasta épocas recientes, y correspondiendo a especies del género *Emarginula* (Benton, 1993).

En el Pacífico Sudoriental, el primer registro fósil del género describe las especies extintas *F. lebuensis* y *F. chica*, en yacimientos de la costa chilena central datados en el Mioceno. Es en el Plioceno donde, además de registrarse fósiles clasificados como *Fissurella* “div. sp.” y *Fissurella concolor*, aparece ya el primer registro de una especie actualmente existente: *F. crassa* (Herm, 1969 en McLean, 1984).

El registro de esta *F. crassa* pliocénica es congruente con los resultados de la filogenia molecular del género. Así, esta especie es localizada en las posiciones más basales de las diversas topologías reconstruidas. En concreto, en los análisis de distancias, esta especie se muestra como la rama más ancestral del género.

Esta coherencia indica la idoneidad de usar la datación en el Plioceno superior como el punto de radiación de las especies de *Fissurella*. Debido a la

presencia de especies cercanas filogenéticamente en el Mioceno es apropiado el uso de una datación alrededor de 5 Ma AP.

Durante el Plioceno superior, la presencia de lapas en el Pacífico Sudoriental es previa al aislamiento entre el Atlántico y Pacífico (3,5 Ma AP). Por ello, en la estimación del valor máximo de divergencia debe recurrirse a ambas especies, atlánticas y pacíficas, comunicadas ambas áreas durante ese periodo, para considerar el nodo ancestral del grupo. Así, la mayor distancia entre las especies de *Fissurella* consideradas se sitúa en el 26,80% (distancia neta=13,40), por lo que la tasa de mutación para el citocromo b es de 2,68%/Ma.

El segundo punto de calibración basado en el registro fósil, se basa en la localización, únicamente en yacimientos pleistocénicos, de especies aún existentes en la actualidad: *F. picta*, *F. maxima*, *F. peruviana* y *F. costata*. Datándose el inicio del Pleistoceno en 1,8 Ma AP, y estimándose la mayor distancia entre dichas especies en un 11,14%, se obtiene una tasa de mutación de 3,09%/Ma.

Una aproximación alternativa, independiente y compatible, es la calibración basada en la elevación del Istmo de Panamá, como un evento vicariante, que aísla las poblaciones de organismos marinos del Atlántico y Pacífico, y que constituye un punto de calibración de uso generalizado (Avice, 1994). La diferenciación genética y los eventos de especiación de las especies del Pacífico, deben haber surgido tras el cese del flujo génico entre ambas cuencas oceánicas. La mayor divergencia estimada entre las especies del Pacífico, haciendo referencia al nodo ancestral en esta cuenca, se sitúa en 14,10%. Teniendo en cuenta la datación de la elevación del Istmo en 3,5 Ma AP (Avice, 2000), la tasa de mutación del CYTB se sitúa en 2,01%/Ma.

Por otro lado, la divergencia mínima entre las especies atlánticas y del Pacífico hace referencia al momento de aislamiento o ligeramente previos a tal

situación. Usando esta divergencia, estimada en 23,1%, se calcula una tasa de evolución de 3,30%/ Ma.

Las calibraciones independientes efectuadas, para la secuencia parcial del citocromo b mitocondrial, son altamente congruentes entre ellas y con relación a otras calibraciones para este gen de organismos relacionados (Avice, 1994). La calibración se sitúa entre el 2,01 y 3,30%/Ma, con un valor medio de 2,77%.

Sin embargo, las diferencias observadas, pueden ser debidas a la inexactitud de las dataciones fósiles y a la ausencia de datos de divergencia de especies del Pacífico con distribución tropical y en el hemisferio norte. Así, la calibración de 3,30%/Ma puede ser excesivamente elevada si la distancia de las especies del Atlántico con especies no consideradas del área tropical (incluyendo la costa del Istmo de Panamá), es menor que con respecto a las especies consideradas con distribución en el Pacífico Sudoriental. Además, el aislamiento puede haber sido previo al cierre de la comunicación física entre ambas cuencas, con el resultado de una sobreestimación de la tasa de evolución.

### **V.3.B. Eventos de especiación en el Pacífico Sudoriental**

La calibración del citocromo b permite estimar la datación aproximada de los eventos de especiación y cladogénicos, durante la historia evolutiva de las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental.

La divergencia de los grupos I y II es ancestral, datándose en el Plioceno. Sin embargo, la posición variable de *F. crassa* y *F. nigra* en la zona basal de las topologías no permite una exacta datación. A pesar de ello, si se tienen en cuenta los clados de topología constante, bien soportados (*F. peruviana*, *F. pulchra*, *F. radiosa* y “complejo latimarginata”), excluyendo dichas especies, se obtiene una datación para dicho grupo I de entre 3,5 y 2,14

Ma AP. El ancestro de las especies consideradas constantes dentro del grupo II (*F. maxima*, *F. limbata*, y “complejo costata-picta”) sería más reciente, situándose en los 1,5 - 1 Ma AP. La incorporación de *F. nigra* a este grupo de especies, tal y como aparece bien soportada en algunas topologías (Figura 24), supone una datación anterior, en los 2,13-1,3 Ma AP.

Los clados, en ambos grupos, conteniendo especies hermanas: *F. pulchra* y *F. radiosa* en el grupo I y *F. maxima* y *F. limbata* en el grupo II, presentan idénticas dataciones para su divergencia, situándose entre los 2,18 - 1,30 Ma AP.

Dentro del “complejo latimarginata” (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*) la mayor divergencia, haciendo referencia a su momento de radiación, se remonta a los últimos 200.000-120.000 años.

### V.3.C. Historia evolutiva

Es evidente la diferente abundancia de especies entre el Océano Atlántico y el Pacífico, concretamente en su región peruviana-magallánica. En especial teniendo en cuenta el origen atlántico del género, según lo cual, y en base a las generales observaciones de la biodiversidad, cabría esperar una mayor variedad de especies. La explicación puede encontrarse en el importante episodio de enfriamiento pliocénico, alrededor de 3,0-3,4 Ma AP (Sarnthein & Fenner, 1988), que afecta de forma grave a las especies de moluscos atlánticas, presentes en esa época. Este episodio se asocia a extinciones en la fauna de moluscos del Ártico y Atlántico Norte, pero también con graves consecuencias negativas para dicha fauna tropical y de aguas cálidas y templadas (Briggs 1995). Así, éste y los sucesivos enfriamientos conducirían a la extinción de hasta el 65% de los moluscos bivalvos existentes durante el Plioceno temprano en la costa del sudeste de los EEUU (Stanley, 1986). De forma similar, tanto el Mediterráneo como el Atlántico Norte europeo sufrieron unos importantes y

simultáneos episodios de extinción (Raffi *et al.* 1986). Por ello, es probable un efecto negativo sobre la diversidad de fisurélidos pliocénicos del Atlántico, resultando en la relativa escasez de tales especies actualmente (Briggs, 1995).

Ante este escenario de enfriamiento pliocénico atlántico, la provincia gatiniana, extendiéndose desde Texas (EEUU) hasta Uruguay (Briggs, 1995), constituye un área relativamente preservada climáticamente y una vía de escape hacia el Pacífico, con unas condiciones térmicas más estables y favorables. Concretamente, esta área presenta “bolsas de moluscos relictos del Neogeno” (Petuch, 1988). La elevación del Istmo de Panamá dividirá esta provincia, conllevando alteraciones importantes para ambas cuencas oceánicas y la aparición de especies gemelas a ambos lados del Istmo.

La datación de la divergencia de los clados I y II se remonta a la época en torno al cierre del Istmo de Panamá, y probablemente simultaneado con la divergencia de especies del Pacífico Norte. El origen de los principales clados, excluyendo las especies basales se situaría en la frontera Plio-Pleistocénica.

La costa del litoral chileno, una vez establecidas las condiciones similares a las actuales, con el establecimiento de la corriente circumantártica y el cierre del Istmo de Panamá, constituye un hábitat apropiado para los fisurélidos. La presencia de abundantes hábitats rocosos, la elevada productividad marina, los ciclos de glaciación pleistocénicos asociados con importantes variaciones del nivel del mar y de temperatura, especialmente a altas latitudes, promueven la especiación de los fisurélidos. Así, la datación, basada en las secuencias del CYTB, sitúa dicha especiación en intervalos dispuestos a lo largo del Pleistoceno, y probablemente asociadas con los mayores eventos de glaciación.

La riqueza de especies, resultado de una historia evolutiva que recopila los mayores procesos Pliocénicos y Pleistocénicos sufridos por el planeta y por las peculiaridades del gradiente latitudinal de la extensa costa chilena, debe ser

preservada. Sin embargo, los datos moleculares indican la susceptibilidad de algunas especies y poblaciones, expuestas a una importante explotación. Los datos y resultados aquí aportados pueden constituir una herramienta fundamental para el control racional de la explotación y la adecuada gestión de este recurso. Se incrementa además las posibilidades de estudios de la biología y ecología del género *Fissurella*.



## CONCLUSIONES

- I. Las relaciones filogenéticas de las especies del género *Fissurella*, con distribución en el Pacífico Sudoriental han sido inferidas a partir del análisis de la secuencia parcial nucleotídica de los genes mitocondriales del citocromo b (CYTB), subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (ND1) y ARNr 16S y los nucleares del complejo ribosomal ARNr 18S -ITS1-ARNr 5.8S -ITS2- ARNr 28S e histona H3. Además se ha procedido a la caracterización de patrones de RAPDs para dichas especies. Tales inferencias discrepan y son incompatibles con la actual clasificación y taxonomía, basada en caracteres morfológicos.
- II. La división en subgéneros *Fissurella* Bruguière, 1789 (*sensu stricto*) y *Cremides* H. y A. Adams, 1854, según la presencia, ausencia o proporción relativa de capas de calcita y aragonita en la concha, no tiene justificación en base a los datos moleculares aportados, por no constituir grupos monofiléticos.
- III. Entre las especies analizadas se distinguen dos grupos divergentes. El primero contiene las especies de distribución atlántica (*F. nimbosa* y *F. schrammii*), mientras que el segundo incluye las especies con distribución en el Pacífico Sudoriental. En este último, se distingue una zona basal de las topologías donde las relaciones pueden consensuarse como una politomía, involucrando los clados I y II, además de las especies *F. crassa* y *F. nigra*. El clado I contiene como especie basal a *F. peruviana*,

situándose como especies hermanas, íntimamente relacionadas, *F. radiosa* y *F. pulchra*. Dentro de este grupo se observa, en la posición más externa, un clado en politomía conteniendo a *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*. El clado II, contiene a su vez dos clados, el primero de ellos incluye a las dos especies hermanas *F. limbata* y *F. maxima*, mientras que el segundo contiene una politomía que implica a los especímenes de *F. picta* y *F. costata*.

- IV. Los grupos de especies que presentan relaciones en politomía, se han considerado como “complejo latimarginata” (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesii*) y “complejo costata-picta” (*F. costata* y *F. picta*). Aunque el consenso sobre esta situación proviene de marcadores independientes mitocondriales y nucleares, es requerida una revisión de los caracteres morfológicos, biología y ecología de los taxa implicados para el planteamiento de una revisión formal de su taxonomía.
- V. Los datos paleontológicos, la datación de eventos de la historia evolutiva a través de calibración de un reloj molecular para el gen CYTB (valor medio de 2,77% de divergencia por cada millón de años), y las relaciones filogenéticas inferidas, indican el escenario más probable de la evolución de las especies de *Fissurella* del Pacífico Sudoriental. La colonización del Pacífico, a partir de una forma ancestral Atlántica, tendría lugar en el Plioceno, desde el Atlántico a través de la región caribeña. La elevación del Istmo de Panamá conduciría al aislamiento de las especies atlánticas y pacíficas,

posibilitando su aislamiento y diferenciación genética. Dicha elevación, junto con enfriamientos pliocénicos, y los posteriores eventos de glaciación pleistocénicos serían motores de la especiación en el Pacífico Sudoriental.

**VI.** La estructura genética poblacional de *F. crassa*, *F. limbata* y del complejo *F. latimarginata*-*F. cumingi*, indica un elevado flujo génico entre las áreas muestreadas. Los niveles de diversidad genética y la historia demográfica parecen ser sensibles a factores como el grado de protección del hábitat a la explotación y depredación, o a bruscos cambios en el nivel del mar. El nivel de flujo génico estimado tiene implicaciones para la gestión de sistemas de explotación de este recurso. Las poblaciones locales difícilmente sufrirían un colapso si son susceptibles de ser colonizadas mediante flujo larvario natural o repobladas, sin conllevar pérdida de variabilidad genética.

**VII.** Los datos obtenidos de las secuencias parciales del CYTB, permiten una metodología de PCR-RFLP, dirigida a la autenticación de las lapas del subgénero *Fissurella* presentes en la costa del Pacífico Sudoriental, mediante la digestión de un amplicón del CYTB con las enzimas *HpyCH4 V* y *Nla III* y la observación de los patrones de restricción específicos. Esta metodología es aplicable a la autenticación de toda la gama de presentación comercial de las lapas del género *Fissurella*. También es de aplicación en la identificación de individuos en cualquier estadio de su desarrollo ontogenético (huevos, embriones, larvas, semillas, estados de reciente asentamiento y

juveniles) y podría ser de gran utilidad en estudios de biología básica, pesquera y en ecología, así como trazabilidad de las especies del género *Fissurella* durante la cadena de comercialización.

## **BIBLIOGRAFÍA**





- Acuña, E. 1977. Estudio preliminar de edad y crecimiento de *Fissurella latimarginata* (Sowerby, 1834) en Tocopilla, Chile (Mollusca, Gastropoda, Fissurellidae). *Revista de Biología Marina* 16(2): 117-124.
- Alamo, A. & Bouchon, M. 1987. Changes in the food and feeding of the sardine (*Sardinops sagax*) during the years 1980-1984 off the Peruvian coast. *Journal of Geophysical Research* 92: 411-415.
- Aldea, C. & Valdovinos, C. 2005. Moluscos del intermareal rocoso del centro-sur de Chile (36° - 38°): Taxonomía y clave de identificación. *Gayana* 69 (2): 364-396.
- Almeida, F.S. & Koelblinger S., L.M. 2002. Comparative study by RAPD analysis of six species of the Pimelodidae family (Osteichthyes, Siluriformes) from the Ibagi River, state of Paraná, Brazil. *Maringá* 24(2): 513-517.
- Alvarez, R. 2004. Conchales arqueológicos y comunidades locales de Chiloé a través de una experiencia de educación patrimonial. *Chungará (Arica)* 36 (supl.): 1151-1157.
- Ávila, S.P. & Malaquias, M.A.E. 2003. Biogeographical relationships of the molluscan fauna of the Ormonde seamount (Corringe Bank, northeast Atlantic ocean). *Journal of Molluscan Studies* 69: 145-150.
- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. USA. 511pp.
- Avise, J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. 447 pp.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sunderland, Massachusetts. 684 pp.
- Bacci, G. 1947. Osservazioni sulla sessualità degli Archaeogastropoda. *Archivio Zoologico Italiano* 32: 329-341.
- Báez, P., Arata, J. & Jackson, D. 2004. El loco *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789) (Mollusca: Gastropoda: Muricidae) como recurso durante el Holoceno Temprano-Medio en Los Vilos, Chile central. *Investigaciones Marinas, Valparaíso* 32(1): 107-113.

- Bahamondes-Rojas, I. & Bretos, M. 2002. Induction of spawning and early development in *Fissurella picta* (Mollusca: Archaeogastropoda) from southern Chile. National Shellfisheries Association. 21 (1): 185-192.
- Bakun, A. & Nelson, C. 1991. The seasonal cycle of wind stress curl in sub-tropical eastern boundary current regions. Journal of Physical Oceanography 21: 1815-1834.
- Balech, E. 1954. División zoogeográfica del litoral Sudamericano. Revista de Biología Marina (Chile) 4:184-195.
- Bandelt, H.J., Forster, P. & Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37-48.
- Barracough, T.G. & Herniou, E. 2003. Why do species exist? Insights from sexuals and asexuals. Zoology 106: 275-282.
- Baum, D.A., Smith, S.D. & Donovan, S.S.S. 2005. The tree-thinkig challenge. Science 310: 979-980.
- Beedham, G. & Trueman, E. 1967. The relationship of the mantle and the shell of the Polyplacophora in comparison with that of other Mollusca. Journal of Zoology 151: 215-231.
- Beedham, G. & Trueman, E. 1968. The cuticle of the Aplacophora and its evolutionary significance in the Mollusca. Journal of Zoology 154: 443-451.
- Benitez, A. 1994. Características climáticas y geológicas de Chile. Capítulo 1. En: Perfil Ambiental de Chile. En: Espinoza G., P. Pisan, L. Contreras & P.A. Camus (eds). Perfil ambiental de Chile: 19-37. Comisión Nacional del Medio Ambiente, Santiago, Chile. 416 pp.
- Benton, M. J. 1993. The Fossil Record 2. Chapman & Hall, London, 845 pp.
- Bergström, J. 1986. Metazoan evolution - a new model. Zoologica Scripta 15(3): 189-200.
- Bieler, R. 1992. Gastropod phylogeny and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 23: 311-338.



- Bonnaud, L., Boucher-Rodoni, R. & Monnerot, M. 1994. Phylogeny of decapod cephalopods based on partial 16S rDNA nucleotide sequences. *Comptes rendus de l'Académie des sciences, Paris* 317: 581-588.
- Boore, J.L. & Brown, W.M. 1994. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the black chiton *Katharina tunicate*. *Genetics* 138: 423-443.
- Boore, J.L. & Staton, J.L. 2002. The mitochondrial genome of the sipunculid *Phascolopsis gouldii* support its association with Annelida rather than Mollusca. *Molecular Biology and Evolution*. 19(2): 127-137.
- Bretos, M. 1978. Growth in the keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamarck (Mollusca: Archaeogastropoda) in northern Chile. *Veliger* 21(2): 268-273.
- Bretos, M. 1979. Observaciones sobre *Fissurella bridgesii* Revé, 1849, en Tarapacá, norte de Chile. *Ciencia y Tecnología del Mar, CONA* 4: 53-60.
- Bretos, M. 1982. Biología de *Fissurella máxima* Sowerby (Mollusca: Archaeogastropoda) en el norte de Chile. 1. Caracteres generales, edad y crecimiento. *Cahiers de Biologie Marine*. Tome XXIII: 159-170.
- Bretos, M. 1988. Pesquería de lapas en Chile. *Medio Ambiente*, 9 (2): 7-12.
- Bretos, M. 1980a. Age determination in the keyhole limpet *Fissurella crassa* Lamarck (Archaeogastropoda: Fissurellidae), based on shell growth rings. *Biological Bulletin* 159: 606-612.
- Bretos, M. 1980b. La formación de anillos de crecimiento en *Fissurella crassa* en el norte de Chile. *Boletim do Instituto Oceanográfico, São Paulo* 29(2): 69-71.
- Bretos, M. & Chihuaif, R. 1990. Biometría y otros aspectos biológicos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosobranchia). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 25 (1): 1-14.
- Bretos, M. & Chihuaif, R. 1993. Studies on the reproduction and gonadal parasites of *Fissurella pulchra* (Gastropoda: Prosobranchia). *Veliger* 36(3): 245-251.
- Bretos, M. & Jiron, C. 1980. Trematodes in Chilean Fissurellid molluscs. *Veliger* 22(3): 293-293.

- Bretos, M., Gutierrez, J. & Espinza, Z. 1988a. Estudios biológicos para el manejo de *Fissurella picta*. Medio Ambiente 9(1):28-34.
- Bretos, M., Quintana, V. & Ibarrola, V. 1988b. Bases biológicas para el manejo de *Fissurella nigra*. Medio Ambiente 9(1):55-62.
- Bretos, M., Tesorieri, I. & Alvarez, L. 1983. The biology of *Fissurella maxima* Sowerby (Mollusca:Archaeogastropoda) in northern Chile. 2. Notes on its reproduction. Biological Bulletin 165: 559-568.
- Briggs, J. 1995. Global Biogeography. Amsterdam ELSEVIERSCIENCE. 452 pp.
- Bromham, L. & Penny, D. 2003. The modern molecular clock. Nature 4: 216-224.
- Brooke, N.M. & Holland, P.W.H. 2003. The evolution of multicellularity and early animal genomes. Current Opinion in Genetics and Development 13: 599-603.
- Brown, A.F., Kann, L.M. & Rand, D.M. 2001. Gene Flow versus local adaptation in the northern acorn barnacle, *Semibalanus balanoides*: insights from mitochondrial DNA variation. Evolution 55(10): 1792-1799.
- Brown, B., Gaina, C. & Müller, R.D. 2006. Circum-Antarctic palaeobathymetry: Illustrated examples from Cenozoic to recent times. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology 231: 158-168.
- Brown, W.M., George, M., & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76 (4): 1967-1971.
- Bush, G.L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis*. Evolution 23: 237-251.
- Bush, G.L. 1975. Modes of animal speciation. Annual Review of Ecology and Systematics 6: 339-364.
- Cain, A. 1970. Las especies animales y su evolución. Nueva colección Labor. Ediciones Labor, S.A. Barcelona. 205 pp.

- Camus, P. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:587-617.
- Castilla, J.C. 1979. Características bióticas del Pacífico Sur-Oriental, con especial referencia al sector chileno. *Revista de la Comisión Permanente del Pacífico Sur* 10: 167-182.
- Castilla, J.C., Lagos, N.A. & Cerda, M. 2004. Marine ecosystem engineering by the alien ascidian *Pyura praeputialis* on a mid-intertidal rocky shore. *Marine Ecology Progress Series* 268: 119-130.
- Cecchi, M.C., Guerrero-Bosagna, C. & Mpodozis, J. 2001. El ¿delito? de Aristóteles. *Revista de Historia Natural* 74: 507-514.
- Clarkson, E.N.K. 1986. *Invertebrate Paleontology and Evolution*. Edit. Allen & Unwin. London. 382 pp.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F. & Eggler, P.E. 2000. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationship assessed using partial 28S rDNA and histone h3 sequences. *Zoologica Scripta* 29: 29-63.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Beacham, E. & Macaranas, J.M. 2003. Gastropod phylogeny based on six segments from four genes representing coding or non-coding and mitochondrial or nuclear DNA. *Molluscan Research* 23:123-148.
- Collado, G.A. & Brown, D.I. 2003. Structure of the spermatozoa of two sympatric species of *Fissurella Brugière*, 1789 (Mollusca: Archaeogastropoda) from the southeast coast of South America. *Invertebrate Reproduction and Development* 43: 237-242.
- Collado, G.A. & Brown, D.I. 2005. Morphology of the spermatozoon of the limpet *Fissurella crassa* Lamarck, 1822 (Mollusca: Vetigastropoda). *Invertebrate Reproduction and Development*. 47 (1):19-22.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Crame, J.A. 1996. *Origin and evolutionary radiation of the Mollusca*. Oxford. J.D. Taylor (ed.): University Press, Oxford.

- Crame, J.A. 1999. An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost South America and Antarctica. *Scientia Marina* 63 (Supl.1): 1-14.
- Crisci, J.V., Cigliano, M.M., Morrone, J.J. & Roig-Juñent, S. 1991. Historical biogeography of southern South America. *Systematic Zoology* 40: 152-171.
- Chacama, J. & Muñoz, I. 2001. Patrón funerario pre Chinchorro en un contexto de semisedentarismo y complementariedad ecológica. El sitio Acha-2, extremo norte de Chile ca. 9.500 - 10.000 años a.p. *Chungará (Arica)* 33 (1): 51-54.
- Dayrat, B. & Tillier, S. 2002. Evolutionary relationships of euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 135: 403-470.
- Di Castri, F. & Hajek, E. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Ediciones Universidad de Chile. Santiago. 128 pp.
- Dobzhansky, T., Ayala, G., Stebbins, G. & Valentini, J. 1980. *Evolución*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 558 pp.
- Douzery, E. & Randi, E. 1997. The mitochondrial control region of cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution* 14(1): 1154-1166.
- Dreyer, H. & Steiner, G. 2004. The complete sequende and gene organization of the mitochondrial genome of the gadilid scaphopod *Siphonondemtalium lobatum* (Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 605-617.
- Edmunds, M. 1977. Larval development, oceanic currents, and origins of the opisthobranch fauna of Ghana. *Journal of Molluscan Studies* 43: 301-308.
- Emerson, W.K. 1962. A classification of the scaphopod mollusc. *Journal of Paleontology* 36: 461-482.
- Escribano, R., Daneri, G., Farías, L., Gallardo, V.A., González, H.E., Gutiérrez, D., Lange, C., Morales, C.E., Pizarro, O., Ulloa, O. & Braun, M. 2004. Biological and chemical consequences of the 1997-1998 El Niño in the Chilean coastal upwelling system: a síntesis. *Deep-Sea Research II* 51: 2389-2411.

- Espoz, C., Lindberg, D., Castilla, J.C. & Simison, B. 2004. Los patelogastrópodos intermareales de Chile y Perú. *Revista Chilena de Historia Natural* 77 (2): 257-283.
- Excoffier L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1, 47-50.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.
- Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 401-410.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annual Review of Genetics* 22: 521-565.
- Felsenstein, J. 1995. PHYLIP: Phylogeny inference package. [3.572]. Seattle, WA., University of Washington.
- Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Fonseca, T. & Farías, M. 1987. Estudio del proceso de surgencia en la costa chilena utilizando percepción remota. *Investigaciones Pesqueras* 34: 33-46.
- Frassinetti, D. 1997. Moluscos del Plioceno superior marino de Isla Guafo, sur de Chile. Parte I. Bivalvia. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 46: 55-79.
- Frassinetti, D. 2000. Moluscos del Plioceno superior marino de Isla Guafo, sur de Chile. Parte II. Gastropoda. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 49:131-161.
- Frassinetti, D. 2001. Moluscos bivalvos y gastrópodos del mioceno marino de Isla Stokes, sur de Chile. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 50: 73-90.

- Frassinetti, D. 2004. Moluscos fósiles del Mioceno marino de Isla Ipún, sur de Chile. Boletín del Museo de Historia Natural, Chile 53: 71-83.
- Frassinetti, D. & Covacevich, V. 1993. Bivalvos del Mioceno marino de Matanzas (formación Navidad, Chile central. Boletín del Museo de Historia Natural, Chile 44: 73-97.
- Gaete, N., Navarro, X., Constantinescu, F., Mera, C., Selles, D., Solari, M., Vargas, M., Oliva, D. & Durán, L. 2004. Una mirada al modo de vida canoero del mar interior desde Piedra Azul. Chungará (Arica) 36 (supl.): 333-346.
- Gallardo, M. 2003. Genome dynamics, genetic complexity and macroevolution. Revista chilena de historia natural 76(4): 717-724.
- Gallardo, V.A. 1975. On a benthic sulfide system on the continental shelf of North and Central Chile. Proceedings of the International Symposium Coastal upwelling. J.C. Valle (ed.), Coquimbo, Chile pp. 113-118.
- Geiger, D. & Thacker, C.E. 2005. Molecular phylogeny of Vetigastropoda reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea and Fissurelloidea. Molluscan Research 25 (1): 47-55.
- Ghiselin, M. 1965. Reproductive function and the phylogeny of opisthobranch gastropods. Malacología 3: 327-378.
- Girebet, G., Opuoso, A., Lindaren, A.R., Huff, S.W., Schrod, M. & Nishiguchi, M.K. 2006. Evidence for a clade composed of mollusc with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(20): 7723-7728.
- Golikov, A.N. & Starobogatov, Y.I. 1975. Systematics of prosobranch gastropods. Malacología. 15:185-232.
- Graham, A. 1973. The anatomical basis of function in the bucal mass of prosobranch and amphineuran molluscs. Journal of Zoology 169: 317-348.
- Griffin, M. 1999. Moluscos marinos cenozoicos de los alrededores de la Serena Coquimbo, IV Región, Chile. Servicio Nacional de Geología y Minería. Sección Paleontología y Estratigrafía. Informe Paleontológico Externo 1-6.

- Guzmán, N., Marquardt, C., Ortlieb, L. & Frassinetti, D. 2000. La malacofauna neogena y cuaternaria del área de Caldera (27°-28°S): Especies y rangos bioestratigráficos. IX congreso Geológico Chileno 1: 476-481.
- Guzmán, N., Saa, S. & Ortlieb, L. 1998. Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). Estudios Oceanológicos 17: 17-86.
- Halpin, P.M., Strub, P.T., Peterson, W.T. & Baumgartner, T.M. 2004. An overview of interactions among oceanography, marine ecosystems, climatic and human disruptions along the eastern margins of the Pacific Ocean. Revista Chilena de Historia Natural 77: 371-409.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Harasewych, M.G. & McArthur, A.G. 2000. A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). Marine Biology 137: 183-194.
- Harasewych, M.G., Adamkewicz, S.L., Blake, J.A., Saudek, D.M., Spriggs, T. & Bult, C.J. 1997. Neogastropod phylogeny: a molecular perspective. Journal of Molluscan Studies 63(3): 327-351.
- Haszprunar, G. 1987. The fine structure of the ctenidial sense organs (bursicles) of Vetigastropoda (Zeugobranchia, Trochoidea) and their functional and phylogenetic significance. Journal of Molluscan Studies 53: 46-51.
- Haszprunar, G. 1988. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura. Journal of Molluscan Studies 54: 367-441.
- Hatzoglou, E., Rodakis, G.C. & Lecanidou, R. 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the land snail *Albinaria coerulea*. Genetics 140: 1353-1366.
- Healy, J.M. 1993. Comparative sperm ultrastructure and spermiogenesis in basal heterobranch gastropods (Valvatoidea, Architectonicoidea, Rissoelloidea, Omalogyroidea, Pyramidelloidea) (Mollusca). Zoologica Scripta 22(3): 263-276.

- Hellberg, M.E. 1998. Sympatric sea shells along the sea's shore: the geography of speciation in the marine Gastropod *Tegula*. *Evolution* 52 (5): 1311-1324.
- Hengeveld, R. 1990. Dynamic biogeography. Cambridge University Press. Great Britain. 250 pp.
- Hillis, D.M. & Huelsenbeck, J.P. 1994. Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *Journal of Heredity* 83: 189-195.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Porter, C.A. & Baker, R.J. 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251: 308-310.
- Hinojosa, L.F. & Villagrán, C. 1997. Historia de los bosques templados del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 225-239.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F., Nielsen R. & Bollback, J.P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Innis, M.A. & Gelfand, D.H. 1991. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York. 185 pp.
- Jackson, D. 1993. Datación radiocarbónica para una adaptación costera del Arcaico Temprano en el Norte Chico, Comuna de Los Vilos. *Boletín de la Sociedad Chilena de Arqueología* 16: 28-31.
- Jackson, D., Seguel, R., Báez, P. & Prieto, X. 1999. Asentamientos y evidencias culturales del Complejo Huentelauquén en la comuna de Los Vilos, Provincia de Choapa. *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 24: 5-28.
- Jara, F.H. & Moreno, C. 1984. Herbivory and structure in a midlittoral, rocky community: a case in the southern Chile. *Ecology* 65: 28-38.
- Kornet, D.J., Metz, J.A.J. & Schellinx, H.A.J.M. 1995. Internodons as equivalent classes in genealogical networks: building-blocks for a rigorous species concept. *Journal of Mathematical Biology* 34(1): 110-122.



- Krebs, C. 2001. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. Benjamin Cummings. USA. 695 pp.
- Kumar, S., Tamura, N. & Nei, M. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis (with a 130 page printed manual). Pennsylvania State University.
- Kurabayachi, A. & Ueshima, R. 2000. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization. *Molecular Biology and Evolution* 17: 266-277.
- Labarca, C. & Paigen, K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry* 102: 344-352.
- Lancellotti, D.A. & Vásquez, J.A. 1999. Biogeographical patterns of benthic macroinvertebrates in the Southeastern Pacific littoral. *Journal of Biogeography* 26: 1001-1006.
- Lee, W., Conroy, J., Howel, W.H. & Kocher, T.D. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41: 54-66.
- Letelier, S., Vega, M.A., Ramos, A.M. & Carreño, E. 2003. Base de datos del Museo Nacional de Historia Natural. Moluscos de Chile. *Revista de Biología Tropical* 51 (Supl.3): 33-50.
- Lindberg, D.R. & Matzen, B. 2004. Anna Meyer and the distinction between grades and clades in early models of gastropod evolution. *Invertebrate Biology* 123 (3): 212-217.
- Lindberg, D.R. & Ponder, W.F. 2001. The influence of classification on the evolutionary interpretation of structure-a re-evaluation of the evolution of the pallial cavity of gastropod mollusc. *Organisms Diversity and Evolution* 1: 273-299.
- Lindner, G. 2000. Moluscos y Caracoles de los Mares del Mundo. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 320 pp.
- Liu, H-P. & Hershler, R. 2005. Molecular systematics and radiation of western North American nymphophiline gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 284-298.

- López D.A., González, M.L. & Pérez, M.C. 2003. Feeding and growth in the keyhole limpet, *Fissurella picta* (Gmelin, 1791). Journal of Shellfish Research 22 (1): 165-169.
- López, D.A., González, M.L., Martínez, R.I. & Vergara, P.A. 1999. Effect of cirripeds on the keyhole limpet *Fissurella picta* (Gmelin). Ciencias Marinas 25 (1): 75-90.
- Lowenstam, H. 1954. Environmental Relations of Modification Compositions of Certain Carbonate Secreting Marine Invertebrates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 40 (1): 39-48.
- Llagostera, A. 1989. Capítulo IV: Caza y pesca marítima (9.000 a 1.000 a.C.). En: Culturas de Chile Prehistoria. Desde sus Orígenes hasta los Albores de la Conquista, editado por C. Aldunate e I. Solimano, pp. 57-79. Editorial Andrés Bello, Santiago.
- Mallet, J. 2001. The speciation revolution. Journal of Evolutionary Biology 14: 887-888.
- Margulis, L. & Schwartz, K.V. 1988. Five kingdoms: An illustrated guide of the Phyla of life on earth. 2nd ed. W.H. Freeman, New York.
- Marincovich, L. 1973. Intertidal mollusks of Iquique, Chile. Natural History Museum, Los Angeles County. Science Bulletin 16: 1-49.
- Marquardt, C., Blanco, N., Godoy, E., Lavenu, A., Ortlieb, L., Marchant, M. & Guzmán, N. 2000. Estratigrafía del cenozoico superior en el área de Caldera (26° 45'-28°S), III Región de Atacama, Chile. IX congreso Geológico Chileno 1: 504-508.
- Martínez, S. & del Río, C.J. 2002a. Late miocene molluscs from the southwestern Atlantic Ocean (Argentina and Uruguay): a paleobiogeographic analysis. Palaeo 188: 167-187.
- Martínez, S. & del Río, C. 2002b. Las provincias malacológicas miocenas del Atlántico sudoccidental. Anales de Biología. 24: 121-130.
- Mayr, E. 1968. Especies animales y evolución. Ediciones Universidad de Chile & Ariel, S.A. Santiago-Barcelona. 808 pp.

- McElroy D., Moran, P., Bermingham, E. & Kornfield, I. 1992. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. *Journal of Heredity* 83: 157-158.
- McLean, J.H. 1984. Systematics of *Fissurella* in the Peruviana and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranquia). *Natural History Museum of Los Angeles County, Contributions in Science* 354: 1-70
- Méndez, C.A. 2002. Cazadores recolectores costeros y sus contextos de tarea: Una visión desde el asentamiento holocénico temprano de Punta Penitente (LV. 014), Los Vilos. *Chungara* 34(2): 153-166.
- Merritt, T.J.S., Shi, L., Chase, M.C., Rex, M.A., Etter, R.J. & Quattro, J.M. 1998. Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1): 7-11.
- Monge-Nájera, J. 2003. Introducción: un vistazo a la historia natural de los moluscos. *Revista de Biología Tropical* 51 (Suppl. 3): 1-3.
- Millard V. 1997. Classification of Mollusca: A classification of worldwide Mollusca. South Africa. 544 pp.
- Moreno, C.& Jaramillo, E. 1983. The role of grazers in the zonation of intertidal macroalgae of the Chilean coast near Valdivia. *Oikos* 41: 73-76.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc. 333 pp
- Nei, M., Stephens, J.C. & Saitou, N. 1985. Methods for computing the standard errors of branching points in an evolutionary tree and their application to molecular data from humans and apes. *Molecular Biology and Evolution* 2: 66-85.
- Nielsen, S.N. 2003. Los gastrópodos marinos (excluyendo Heterostropha) del Mioceno de Chile central. Tesis Doctoral. Universidad de Hamburgo. 229 pp.
- Nielsen, S.N., Frassinetti, D. & Bandel, K. 2004. Miocene Vetigastropoda and Neritimorpha (Mollusca, Gastropoda) of central Chile. *Journal of South American Herat Sciences* 17: 73-88.

- Núñez, L. & Hall, H. 1982. Análisis de dieta y movilidad en un campamento arcaico del norte de Chile. Boletín del Instituto Francés de Estudios Andinos 11 (3-4): 91-113.
- Olguín, A. & Jerez, G. 2003. Chile. Especies bentónicas de importancia comercial. Serie – Chile: Recursos Pesqueros N° 1, IFOP, 30pp.
- Oliva, D. & Castilla, J.C. 1986. The effect of human exclusion on the population structure of key-hole limpets *Fissurella crassa* and *F. limbata* on the coast of central Chile. Marine Ecology 7(3): 201-217.
- Oliva, D. & Castilla, J.C. 1992. Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella* Bruguière, 1789 (Mollusca:Gastropoda) comunes en la pesquería y conchales indígenas de Chile central y sur. Gayana Zoología,56 (3-4):77-108.
- Oliva, M. 1992. Parasitic castration in *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda) due to an adult Digenea *Proctoeces lintoni* (Fellodistomidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87(1): 37-42.
- Oliva, M. & Díaz, M. 1988. Aspectos cuantitativos de la infección por *Proctoeces humboldti* (Trematoda: Fellodistomidae) en la lapa *Fissurella crassa* (Mollusca: archaeogastropoda). Revista Chilena de Historia Natural 61: 27-33.
- Oliva, M. & Díaz, M. 1992. An ecological approach to the study of infección por *Proctoeces lintoni* (Digenea, Fellodistomidae) in the key limpet *Fissurella limbata* Sowerby, 1835 (Archaeogastropoda) from northern Chile. Acta Parasitológica 37(3): 115-118.
- Olivares, A., Bretos, M., Chihuailaf, R. & Zenis, A. 1998. Biometría, hábitat y epibiontes en *Fissurella latimarginata* (mollusca: prosobranchia) en el norte de Chile. Estudios Oceanológicos 17: 95-103.
- Olivares, A., Quinteiro, J. & Rey-Méndez, M. 2006. Autentificación de lapas del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR-RFLP. Investigaciones Marinas. 34(1): 113-118.
- Osorio, C. 2002. Moluscos Marinos en Chile. Especies de importancia económica. Guía para su identificación. Facultad de Ciencias Universidad de Chile, Santiago. 211 pp.

- Osorio, C., Peña, R., Ramajo, L. & Garcelon, N. 2006. Malacofauna bentónica de los canales oceánicos del sur de Chile (43° - 45°S). *Ciencia y Tecnología del Mar* 29 (1): 103-114.
- Osorio, C., Ramirez, M.E. & Salgado, J. 1988. Gastric content of *Fissurella maxima* (Mollusca: Archaeogastropoda) at Los Vilos, Chile. *Veliger* 30(4): 347-350.
- Palmer, A.R. 1992. Calcification in marine mollusc: how costil is it?. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 1379-1382.
- Palumbi, S.R. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25: 547-572.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G. 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR*. University of Hawaii, Honolulu. pp. 1-44.
- Penny, D., Hendy, M.D. & Steel, M.A. 1992. Progress with the methods for constructing evolutionary trees. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 73-79.
- Pereira, L., Alvarez, C., Céspedes, L., Rivera, M., Solar, C. & Quezada, S. 2006. Conditioning of broodstocks, larval, post larval and juvenile culture of the black keyhole limpet *Fissurella latimarginata* in the laboratory. VI International Abalone Symposium. Puerto Varas- Chile. Books of Abstracts. P:4 (OTRO p:18).
- Pérez-Farfante, I. 1952. Nuevo género y nueva especie del género *Fissurella*. *Revista de la Sociedad Malacológica "Carlos de la Torre"* (Habana) 9 (1): 31-33.
- Petuch, E.J. 1988. *Neogene history of tropical American mollusks*. Coastal Education and Research Foundation, Charlottesville, VA.
- Ponder, W.F. & Lindberg, D.R. 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society London* 119: 83-265.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

- Puertas G., M.J.1999. Genética. Fundamentos y Perspectivas. 2º Edición. McGraw-Hill. Interamericana de España. Madrid 913 pp.
- Quesada, H., Skibinski, D.A.G. & Skibinski, D.O.F. 1996. Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA inheritance in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Current Genetics 29 (4): 423-426.
- Quesada, H., Stuckas, H., & Skibinski, D.O.F. 2003. Heteroplasmy Suggests Paternal Co-transmission of Multiple Genomes and Pervasive Reversion of Maternally into Paternally Transmitted Genomes of Mussel (*Mytilus*) Mitochondrial DNA. Journal of Molecular Evolution 57: 138-147.
- Quinteiro, J., Rodriguez-Castro, J., Castillejo, J., Iglesias-Piñeiro, J. & Rey-Méndez, M. 2005. Phylogeny of slug species of the genus *Arion*: evidence of monophyly of Iberian endemics and of the existence of relict species in Pyrenean refuges. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 43 (2): 139-148.
- Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Pérez-Martín, R.I., Rey-Méndez, M. & Mackie, I.M. 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 1662-1669.
- Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M. & Rey-Méndez, M. 2001 Análisis de las secuencias del gen mitocondrial ARNr 16S de especies de bivalvos utilizadas en acuicultura. Monográfico del Instituto Canario de Ciencias Marinas 4: 567-574.
- Quiroz, D. & Sánchez, M. 2004. Poblamientos iniciales en la costa septentrional de la Araucanía (6.500-2.000 a.p.). Chungará (Arica) 36 (suppl): 289:302.
- Raffi, S., Stanley, S.M. & Marasti, R. 1986. Biogeographic patterns and Plio-Pleistocene extinction of Bivalvia in the Mediterranean and southern North Sea. Paleobiology 11: 368-388.
- Ramirez-Boehme, J. 1974. Nuevas especies chilenas de *Lucapina*, *Fissurella* y *Collisella* (MOLLUSCA, ARCHAEOGASTROPODA). Boletín Museo Nacional Historia Natural, Chile 33:15-34.

- Remigio, E.A. & Blair, D. 1997. Relationships among problematic North American stagnicoline snails (Pulmonata, Lymnaeidae) reinvestigated using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Zoology* 75: 1540-1545.
- Remigio, E.A. & Hebert, P.D.H. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 641-647.
- Rice, W.R. 1987. Speciation via habitat specialization: the evolution of reproductive isolation as a correlated character. *Evolutionary Ecology* 1: 301-314.
- Rolán- Álvarez, E., Carballo, M., Galindo, J., Morán, P., Fernández, B., Caballero, A., Cruz, R., Boulding, E.G., & Johannessons, K. 2004. Nonallopatric and parallel origin of local reproductive barriers between two snail ecotypes. *Molecular Ecology* 13: 3415-3424.
- Rollinson, D., Stothard, J.R., Jones, C.S., Lockyer, A. Pereira de Souza, C & L. R. Noble. 1998. Molecular characterisation of intermediate snail hosts and the search for resistance genes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (1): 111-116.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Roy, K., Valentine, J.W., Jablonsky, D. & S. Kidwell. D. 1996. Scales of climatic variability and time averaging in Pleistocene biotas: implications for ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 458-463.
- Rozas, J., Sánchez-del Barrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. 2003. DnaSP, Dna polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruppert, E.E. & Barnes, R.D. 1996. *Zoología de los Invertebrados*. Cap.10: Los Molluscos. Clase Gasterópodos (Gasteropoda). Pp 380 - 425. Mc Graw Hill. México.
- Russell, V.J., Hold, G.L., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Rey-Méndez, M., González-Sotelo, C., Pérez-Martín, R.I., Santos, A.T. & Rosa, C. 2000. Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2184-2188.

- Sacchi, R. 2002. Il neoproterozoico. *Systema Naturae* 4: 9-13
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B & Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Salvini-Plawen, L.v. 1980. A reconsideration of systematics in the Mollusca (Phylogeny and higher classification. *Malacología* 19(2): 249-278.
- Salvini-Plawen, L.v. 1990. Origen, phylogeny and classification of the Phylum Mollusca. *Iberus* 9(1-2): 1-33.
- Sánchez, R. & Gaete, N. 1994. El período alfarero al sur del Maule. *Actas del 2º Taller de Arqueología de Chile Central*. 7 pp.
- Sanderson, M. J. & Shaffer, H.B. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analysis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 49-72.
- Santelices, B. 1989. Algas Marinas de Chile. Distribución. Ecología. Utilización. Diversidad. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 399 pp.
- Santelices, B., Vásquez, J. & Meneses, I. 1986. Patrones de distribución y dietas de un gremio de moluscos herbívoros en habitats intermareales expuestos de Chile central. *Monografías Biológicas* 4: 147-171.
- Sarnthein, M. & Fenner, J. 1988. Global wind-induced change of deep-sea sediment budgets, new ocean production and CO<sub>2</sub> reservoirs about 3.3-3.25 Ma B.P. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. B 318
- Sasaki, T. 1998. Comparative anatomy and phylogeny of the recent Archaeogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *The University Museum, University of Tokio Bulletin* 38: 1-224.
- Schiaparelli, S., Barucca, M., Olmo, E., Boyer, M. & Canapa, A. 2005. Phylogenetic relationships within Ovulidae (Gastropoda: Cypraeoidea) based on molecular data from the 16S rRNA gene. *Marine Biology* 147: 411-420.



- Seguel, R. 2001. El sitio arqueológico Punta Ñagüé: procesos de transformación y estrategias de conservación durante su excavación. *Conserva* 5: 39-55.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2000. Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2003. Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2006. Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.
- Sokolova, I.M. & Boulding, E.G. 2004. A neutral DNA marker suggests that parallel physiological adaptations to open shore and salt marsh habitats have evolved more than once within two different species of gastropods. *Marine Biology* 145: 133-147
- Standen V., Santoro, C. & Arriaza, B. 2004. Síntesis y propuestas para el período arcaico en la costa del extremo norte de Chile. *Chungará (Arica)* 36 (supl.): 201-212.
- Stanley, S.M. 1986. Anatomy of a regional mass extinction: Plio-Pleistocene decimation of the Western Atlantic bivalve fauna. *Palaios* 1: 17-36.
- Stilwell, J. 2003. Patterns of biodiversity and faunal rebound following the K-T boundary extinction event in Austral Palaeocene molluscan faunas. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 195: 319-356.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\*. Phylogenetics analysis using parsimony (\*and other methods).4.0b10. Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Wadell, P.J. & Hillis, D.M. 1996. Phylogenetic inference. In: *Molecular Systematics* (eds. Hillis DM, Moritz C, Mable BK), pp. 407-514. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takahata, N. & Tajima, F. 1991. Sampling errors in phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 8: 494-502.

- Tarazona, J., Salzwedel, H. & Arntz, W.E. 1988. Oscillations of macrobenthos in shallow water off the Peruvian central coast induced by El Niño 1982-83. *Journal of Marine Research* 46: 593-611.
- Taylor, D.W. & Sohl, N.F. 1962. An outline of gastropod classification. *Malacología* 1: 7-32.
- Terrett, J.A., Miles, S. & Thomas, R.H. 1996. Complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: pulmonata). *Journal of Molecular Evolution* 42: 160-168.
- Thomas, E. 1992. Middle Eocene-late Oligocene bathyal benthic Foraminifera (Weddell Sea): faunal changes and implications for ocean circulation. *in: Eocene-Oligocene climatic and biotic evolution* (D.R. Prothero and W.A. Berggren, eds.). Princeton Univ. Press, Princeton, NJ. pp. 245-271.
- Tinaut, A. & Ruano, F. 2002. Biodiversidad, clasificación y filogenia. En: *Evolución. La base de la biología*. Ed. M. Soler. ISBN. pp: 293-306.
- Tomita, K., Yokobori, S., Oshima, T., Ueda, T. & Watanabe, K. 2002. The cephalopod *Loligo bleekeri* mitochondrial genome: Multiplied noncoding regions and transposition of tRNA genes. *Journal of Molecular Evolution* 54: 486-500.
- Turelli, M., Barton, N.H. & Coyne, J.A. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 330-343.
- Van Valen, L. 1976. Domains, deduction, the predictive method, and Darwin. *Evolutionary Theory* 1: 231-245.
- Vásquez, J.A., Camus, P.A. & Ojeda, F.P. 1998. Diversidad, estructura y funcionamiento de ecosistemas costeros rocosos del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 479-499.
- Vaught, K.C. 1989. A Classification of the Living Mollusca. Ed. R. Tucker Abbott and Kenneth J. Boss. Melbourne, FL: American Malacologists. 195 pp.
- Vegas-Velez, M. 1968. Revisión taxonómica y zoogeográfica de algunos gasterópodos y lamelibranquios marinos del Perú. *Anales Científicos Univ. Nac. Agraria*, 6(1/2): 1-29.

- Vergara, F. 2002. La homeosis y la macroevolución. *Ciencias* 65: 1-9.
- Vilaxa, A. & Corrales, J. 1993. Descripción y comentario de la fauna malacológica del sitio Acha - 2. Ediciones Universidad de Tarapacá, Arica-Chile. Pp 81- 89.
- Viviani, C.A. 1979. Ecogeografía del litoral chileno. *Studies on Neotropical Fauna and Enviromental* 14: 65-123.
- Voltzow, J., Morris, P.J. & Linsley, R.M. 2004. Anatomy of and patterns of water currents through the mantle cavities of Pleurotomariid Gastropods. *Journal of Morphology* 262: 659-666.
- Ward, J. 1966. The breeding cycle of the keyhole limpet *Fissurella barbadensis* Gmelin. *Bulletin of Marine Science* 16: 685-695.
- Wiley, E.O. 1978. The Evolutionary Species Concept Reconsidered. *Systematic Zoology* 27(1): 17-26.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T. & De Wachter, R. 1996. Investigation of Molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13(10): 1306-1317.
- Winnepenninckx, B., Steiner, G. Backeljau, T. & De Wachter, R. 1998. Details of Gastropodos phylogeny inferred from 18S rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9(1): 55-63.
- Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology* 141: 173-216.
- Wulschleger, E. & Jokela, J. 2001. Morphological plasticity and divergence in life-history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *Journal of Molluscan Studies* 68: 1-5
- Yamazaky, N., Ueshima, R., Terrett, J.A., Yokobori, S., Kaifu, M., Segawa, R., Kobayashi, T., Numachi, K., Ueda, T., Nishikawa, K., Watanabe, K. & Thomas, R.H. 1997. Evolution of pulmonate gastropod mitochondrial genomes: comparisons of gene organizations of *Euhadra*, *Cepaea* and *Albinaria* and implications of unusual tRNA secondary structures. *Genetics* 145: 749-758.

- Yokobori, S., Fukuda, N., Nakamura, M., Aoyama, T. & Oshima, T. 2004. Long-term conservation of six duplicated structural genes in cephalopod mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution* 21(11): 2034-2046.
- Yoon, S.H. & Kim, W. 2005. Phylogenetic relationships among six Vetigastropod subgroup (Mollusca, Gastropoda) based on 18S rDNA sequences. *Molecules and Cells* 19(2): 283-288.

**ANEXOS**





## Anexo 1

Clave para la determinación de especies del género *Fissurella* comunes en el litoral y conchales de Chile Central y Sur utilizando sólo las conchas (Oliva & Castilla, 1992)

- (1) Contorno de las conchas subcircular; perfil plano; conchas altas con costillas radiales robustas; margen ancho, borde filudo y crenulado....(2)
- (1') Contorno de las conchas alargado u oval; perfil cóncavo en el centro; conchas medianamente altas o bajas con costillas radiales finas o sin costillas; margen de ancho variable, borde suavemente crenulado o redondeado.....(3)
- (2) Costillas primarias y secundarias prominentes; orificio apical pequeño y alargado; superficie dorsal de las conchas de color blancuzco homogéneo, cuando se presentan rayos éstos son de color pardo claro y suelen ser discontinuos formando patrones de coloración concéntricos y se extienden hasta el margen.....*Fissurella costata* Lesson, 1831
- (2') Costillas primarias más prominentes que las secundarias; orificio apical mediano y subcircular. Conchas con rayos entre púrpura oscuro y negro en fondo blancuzco. Margen generalmente monocromo, a veces bandeado.....*Fissurella picta* (Gmelin, 1791)
- (3) Contorno de las conchas alargado, conchas bajas.....(4)
- (3') Contorno de las conchas oval, conchas medianamente altas o bajas.....(5)
- (4) Conchas con costillas radiales prominentes y redondeadas. 13-14 rayos de color púrpura en fondo blancuzco. Margen ancho, muy plano, donde se destaca una zona externa y otra interna. La zona externa sigue el patrón de coloración del dorso. Orificio apical pequeño, alargado en juveniles y circular en adultos.....*Fissurella maxima* Sowerby, 1835
- (4') Conchas lisas con costillas primarias muy suaves y separadas, de color pardo intenso. Con líneas de crecimiento concéntricas prominentes. Margen angosto, plano e intensamente pigmentado. Orificio apical grande con forma de 8.....*Fissurella crassa* Lamarck. 1822
- (5) Conchas medianamente altas, con costillas radiales finas y continuas;

- orificio apical de tamaño mediano.....(6)
- (5') Conchas medianamente altas o bajas, con costillas radiales discontinuas o sin costillas; orificio apical grande.....(7)
- (6) Conchas con costillas radiales primarias y secundarias muy finas, pigmentada uniformemente de pardo-rojizo oscuro. Conchas juveniles presentan 2 rayos laterales más claros que nacen en el orificio apical. El margen filudo, de ancho variable, presenta la misma coloración del dorso.....*Fissurella latimarginata* Sowerby, 1835
- (6') Conchas con costillas radiales finas, siendo las primarias más prominentes que las secundarias. Rayos de color púrpura oscuro sobre fondo gris. Margen medianamente filudo, de ancho variable, de color homogéneo o con patrón de coloración igual al dorso, borde moderadamente crenulado. Perfil levemente levantado en los extremos.....*Fissurella cumingi* Reeve, 1849
- (7) Conchas lisas, sin costillas radiales.....(8)
- (7') Conchas con costillas radiales poco prominentes y discontinuas. Conchas gruesas, bajas con rayos rojo oscuro en fondo amarillento. Margen ancho y redondeado. Orificio apical alargado. Perfil con extremos levantados.....*Fissurella bridgesii* Reeve, 1849
- (8) Conchas bajas y delgadas, con anillos de crecimiento concéntricos débiles; margen ancho, plano intensa y homogéneamente pigmentado.
- (8') Conchas altas, gruesas, con marcados anillos de crecimiento concéntricos; margen ancho, plano con zona interna más clara. Conchas negras o moradas intensas homogéneas; orificio apical elongado con bordes de aragonita (blanco).....*Fissurella nigra* Lesson, 1831
- (9) Conchas bajas; orificio apical elongado con contricción media. Superficie de la concha con rayos morados tenues y delgados sobre fondo morado claro.....*Fissurella limbata* Sowerby, 1835
- (9') Conchas muy bajas; orificio apical tripartito. Superficie de las conchas de color rosado oscuro con rayos tenues sobre fondo más claro y cubierta por líneas zigzagueantes las que son más conspicuas en la cercanía del orificio apical.....*Fissurella pulchra* Sowerby, 1835



## Anexo 2

Clave para la determinación de especies del género *Fissurella* comunes en el litoral y conchales de Chile Central y Sur utilizando animales vivos. (Oliva & Castilla, 1992).

- (1) Pie muy pequeño, oculto por la concha en una vista dorsal; borde del manto angosto. Contorno de las conchas subcircular; conchas altas con costillas radiales robustas, perfil plano, borde del margen crenulado.....(2)
- (1') Pie grande, sobresale de la concha en una vista dorsal; borde del manto angosto o ancho. Contorno de las conchas alargado u oval; conchas medianamente altas o bajas con costillas radiales finas o sin costillas; perfil de las conchas cóncavo en el centro, borde del margen redondeado o levemente crenulado.....(3)
- (2) Pie de color pardo claro jaspeado con tonalidades amarillentas. Conchas color blancuzco homogéneo, cuando se presentan rayos éstos son pardo claro y suelen ser discontinuos.....*Fissurella costata* Lesson 1831
- (2') Pie de color gris oscuro. jaspeado. Conchas con rayos negros en fondo blancuzco.. .....*Fissurella picta* (Gmelin, 1791)
- (3) Pie sobresale de la concha en la zona posterior y zonas laterales.....(4)
- (3') Pie sobresale de la concha en la zona posterior.....(5)
- (4) Pie de color violeta, verrucoso; borde del manto muy ancho y festoneado, pudiendo cubrir gran parte de la concha. Conchas lisas de color rosado oscuro con rayos tenues en fondo más claro. Superficie cubierta por líneas zigzagueantes. más conspicuas en la cercanía del orificio apical.....*Fissurella pulchra* Sowerby, 1835
- (4') Pie de color gris oscuro muy verrucoso; borde del manto angosto. Conchas gruesas con costillas radiales poco prominentes y discontinuas. Rayos de color rojo oscuro en fondo amarillento.....*Fissurella bridgesii* Reeve, 1849
- (5) Conchas alargadas y bajas.....(6)
- (5') Conchas ovales, medianamente altas o bajas.....(7)

- (6) Conchas con costillas radiales finas y prominentes. Superficie de la concha con rayos púrpura en fondo blancuzco. Margen ancho, plano, la mitad externa sigue el patrón de color del dorso. Costados del pie pardo grisáceo muy verrucoso. Borde del manto festoneado, sigue el patrón de coloración de la concha. Tentáculos pardos en la región proximal y amarillos en la distal.....*Fissurella maxima* Sowerby, 1835
- (6') Conchas con costillas radiales suaves y separadas. Conchas de color pardo homogéneo con anillos concéntricos de crecimiento. Orificio apical grande con forma de ocho. Costados del pie pardo con verrugas pequeñas. Borde del manto ancho con un patrón de listas en su coloración. ....*Fissurella crassa* Lamarck, 1822
- (7) Conchas medianamente altas con costillas radiales finas.....(8)
- (7') Conchas medianamente altas o bajas sin costillas radiales.....(9)
- (8) Costados del pie y manto de color negro intenso. Manto festoneado con prolongaciones amarillas. Tentáculos de color amarillo intenso. Concha uniformemente pigmentada de color morado oscuro o pardo. Costillas radiales primarias y secundarias igualmente desarrolladas.....  
.....*Fissurella latimarginata* Sowerby, 1835
- (8') Costados del pie de color rosado intenso con verrugas muy desarrolladas, borde del manto festoneado con patrón de coloración similar al de la concha. Costillas primarias más prominentes que las secundarias. Rayos de color morado sobre fondo gris.....*Fissurella cumingi* Reeve, 1849
- (9) Conchas medianamente altas, gruesas, de color negro homogéneo; bordes del orificio apical de aragonita (blanco). Pie de color gris con pequeños tubérculos. Manto medianamente ancho, de color más claro que el pie.....*Fissurella nigra* Lesson, 1831
- (9') Conchas bajas, con rayos morados tenues y delgados sobre fondo claro. Costados del pie de color blancuzco grisáceo, liso. Manto no festoneado blancuzco grisáceo.....*Fissurella limbata* Sowerby, 1835

### Anexo 3

Clave para la identificación de *Fissurella*, obtenida a partir de “Clave para identificar los moluscos asociados al litoral rocoso del centro-sur de Chile (36° - 38°S)” (Aldea & Valdovinos, 2005)

- (13) Moluscos encerrados por una concha, o sin ésta (Clase Gastropoda) ..... (14)
- (14) Con una concha ..... (15)
- (15) Concha sin espira (vueltas)..... (16)
- (16) Con un orificio apical..... (17)
- (17) Con finas estrías radiales y sin radios de colores marcados..... (18)
- (17') Con costillas radiales fuertes y/o radios de colores marcados..... (20)
- (18) Orificio apical elíptico o alargado, borde de la concha liso..... (19)
- (18') Orificio apical con forma de 8, borde de la concha ondulado y delgado. Color externo castaño rojizo..... *Fissurella crassa* Lamarck 1822
- (19) Superficie con estrías concéntricas de crecimiento mucho más notorias que las estrías radiales, las cuales generalmente son muy tenues o ausentes. Color externo negro. Orificio apical con grueso reborde blanco..... *Fissurella nigra* Lesson 1831
- (19') Superficie con estrías concéntricas y radiales igualmente notorias, pero tenues. Color externo marrón; en estados juveniles presenta un radio de color blanco a cada lado de la concha..... *Fissurella latimarginata* Sowerby 1835
- (20) Con costillas bien marcadas..... (21)
- (20') Con costillas tenues, estrías o bien sin ellas..... (24)
- (21) Con radios de colores notorios..... (22)

- (21') Sin radios de colores o muy poco notorios. Color amarillo cremoso, con escasos radios color marrón pálido, cuando existen..... *Fissurella costata* Lesson 1831
- (22) Concha gruesa alta o medianamente alta con margen ancho, orificio apical grande.... (23)
- (22') Concha delgada muy alta, con margen angosto, orificio apical pequeño. Color externo rojizo con radios marrón..... *Fissurella peruviana* Lamarck 1822
- (23) Concha alta de forma oval, con orificio apical alargado con forma de cerradura. Color amarillento o grisáceo con 15 o más radios color púrpura..... *Fissurella picta* (Gmelin 1791)
- (23') Concha medianamente alta, oval alargada, con orificio apical oval – circular. Color amarillo grisáceo con 13 radios púrpura..... *Fissurella maxima* Sowerby 1835
- (24) Con estrías radiales y de crecimiento..... (25)
- (24') Sólo con estrías de crecimiento..... (27)
- (25) Concha oval – alargada, medianamente alta, con margen grueso.... (26)
- (25') Concha alargada, baja, con margen angosto, redondeado y ligeramente crenulado. Color amarillo con radios anaranjados..... *Fissurella oriens fulvescens* Sowerby 1835
- (26) Concha amarillenta grisácea con radios rojos, borde oscuro color uniforme, pero se traslucen el color de los radios..... *Fissurella cumingi* Reeve 1849
- (26') Concha grisácea con numerosos radios púrpura oscuros entrecortados por las estrías de crecimiento, borde oscuro, área apical blanca, generalmente desgastada..... *Fissurella limbata* Sowerby 1835
- (27) Concha medianamente alta, color marrón rojizo con numerosos radios púrpura, área apical color más claro..... *Fissurella bridgesii* Reeve 1849

- (27') Concha muy baja, color marrón rojizo con radios oscuros, que forman puntos y líneas zigzag..... *Fissurella pulchra* Sowerby 1835

## Anexo 4

Invest. Mar., Valparaíso, 34(1):113-118, 2006

### *Nota Científica*

#### **Autenticación de lapas del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR-RFLP\***

Alberto Olivares-Paz<sup>1,2</sup>, Javier Quinteiro<sup>2</sup> & Manuel Rey-Méndez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Acuicultura, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta  
Casilla 170, Antofagasta, Chile

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología  
Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España

**RESUMEN.** Las lapas, clasificadas en el género *Fissurella*, se explotan desde tiempos prehistóricos en la costa chilena. Las diversas especies de lapas presentan diferencias en la consistencia o dureza del músculo y en cualidades organolépticas, por ello son distintamente valoradas por los consumidores. La ausencia o desconocimiento de los caracteres morfológicos diagnósticos, en algunas presentaciones del recurso, fraudes en el etiquetado o designación y la sobreexplotación de este recurso, demanda una metodología de identificación de cada especie. Este método garantizaría el correcto etiquetado de los productos comerciales y sería de utilidad en la gestión pesquera. Así, se diseñó un protocolo de PCR-RFLP que permite la identificación de diferentes especies de *Fissurella*, teniendo en cuenta incongruencias entre la taxonomía actual del género y los datos genéticos. La digestión de productos de PCR, con dos enzimas de restricción específicas (*Hpy*CH4 V y *Nla* III), genera patrones específicos de restricción, los cuales permitirán identificar con precisión las diversas especies en cualquier fase de su comercialización y de su ciclo biológico.

**Palabras clave:** lapas, *Fissurella*, PCR-RFLP, autenticación, Chile.

#### **Authentication of *Fissurella* species (Mollusca: Vetigastropoda), harvested in the Chilean coast, by PCR-RFLP\***

**ABSTRACT.** Keyhole limpets, belonging to the *Fissurella* genus, have been harvested along the Chilean coast since prehistoric times. Exploited species show differences in tissue consistency and organoleptic features, and so are differently appreciated by consumers. The absence of morphological diagnostic characters in some food products elaborated using limpets, fraudulent commercial labeling or designation, and the overexploitation of this marine resource, suggest the need for a species identification methodology. The method would be a tool to guarantee the correct labeling of commercial products and for future fishery management purposes. A PCR-RFLP protocol, using two restriction enzymes (*Hpy*CH4 V and *Nla* III) allowed species identification within the *Fissurella* genus along Chilean coast, suggesting incongruence between classical taxonomy and genetic data. The specific restriction patterns are expected to be useful for species authentication in commercial products and for species identification in any phase of the life-cycle of *Fissurella* species.

**Key words:** keyhole limpets, *Fissurella*, PCR-RFLP, authentication, Chile.

Los especímenes de mayor tamaño del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) habitan la zona litoral costera de Chile (18,4°-56,0°S) (Bretos & Chihuailaf, 1993). Llamadas popularmente lapas o chapas, desde tiempos prehistóricos han formado parte de la dieta humana (Jerardino *et al.*, 1992; Gaete *et al.*, 2004). Actualmente, de las 13 especies validadas (McLean, 1984), 10 de ellas (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. pulchra*, *F. bridgesii*, *F. costata*, *F. nigra*, *F. picta*, *F. maxima*, *F. crassa* y *F. limbata*) forman una pesquería multiespecífica, con la denominación genérica *Fissurella* spp. (Bretos, 1988). Además, *F. oriens* y *F. radiosa* se consumen en las localidades donde son extraídas. Por el contrario, *F. peruana* es de tamaño pequeño (máximo 30 mm) y no se extrae para fines de consumo ni para su comercialización.

Las distinciones entre las especies están fundamentadas en caracteres morfológicos, morfométricos y patrones de coloración de la concha, pie, manto y cabeza, los cuales a veces suelen ser parecidos entre organismos de especies diferentes (McLean, 1984; Oliva & Castilla, 1992; Guzmán *et al.*, 1998). También, los caracteres distintivos están enmascarados o deteriorados por los organismos epibiontes y la coloración del cuerpo se pierde después que el organismo ha sido extraído (Olivares *et al.*, 1998). Todo esto, frecuentemente, dificulta distinguir las diferentes especies.

En la última década se ha extraído un promedio anual de  $2.939 \pm 585$  ton de *Fissurella* spp. y desde el año 2000, menos del 10% del desembarque pesquero se ha desglosado con las denominaciones vernaculares de lapa negra, reina y rosada, las cuales

corresponden a las especies *F. latimarginata*, *F. maxima* y *F. pulchra* o *F. cumingi*, respectivamente (Bretos, 1988; Osorio, 2002; SERNAPESCA, 2003). Parte de la comercialización se realiza directamente al público como producto fresco entero y fresco desconchado eviscerado; pero mayoritariamente se destina a la industria pesquera, la cual procesa el músculo del pie en la forma de fresco refrigerado, congelado y en conserva (Osorio, 2002). El procesamiento industrial implica la pérdida total de los caracteres de las especies, resultando imposible su distinción.

El consumidor tiene preferencias particulares por algunas especies, respecto de otras, ya sea por el rendimiento de carne, consistencia o cualidades organolépticas del pie muscular; todo lo cual ha generado una sobreexplotación de algunas especies (Bretos, 1988; Olivares *et al.*, 1998; Oliva & Castilla, 1992) y conlleva la tendencia a expender suplantando el nombre de las lapas de mayor aprecio por parte de los consumidores.

El presente trabajo da a conocer una metodología de PCR-RFLP (Polimerasa Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) que permite la autenticación de las especies del género *Fissurella*, actualmente explotadas en Chile, la cual fue diseñada según las secuencias mitocondriales descritas previamente para las especies. Además, se presenta la incongruencia entre los resultados de la metodología y la clásica asignación de especies, descritas a partir de los variables y pocos precisos caracteres morfológicos, para la exhaustiva identificación de algunas especies.

A ejemplares de todas las especies de *Fissurella* (N = 4 a 18, por especie), excepto *F. peruana*, se aisló ADN a partir de tejido muscular del pie, mediante el uso del kit DNeasy Tissue (Qiagen). Un fragmento de 410 pb (pares de bases), localizado en el gen mitocondrial citocromo b, fue amplificado mediante PCR con los cebadores UCYTB151F y UCYTB272R (Merritt *et al.*, 1998). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 30 µL conteniendo Promega Buffer x 1, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,1 µM de cada cebador, 0,025 U/I de Taq DNA polimerasa (Promega) y 0,5 µL de DNA total. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, fusión a 50°C y extensión a 72°C por 20, 30 y 60 s, respectivamente, más una extensión final a 72°C por 5 min. El producto de la amplificación y digestión fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa, visualizándolo en transiluminador de luz ultravioleta.

La detección de sitios polimórficos localizados dentro de dianas de enzimas de restricción comerciales, se realizó

analizando las secuencias depositadas para las especies en el GenBank/EMBL/DDBJ (Números de acceso: AY940884-AY940976), mediante el programa BioEdit version 7.0.1 (Hall, 1999). Se seleccionaron las enzimas *Nla* III (CATG') y *Hpy*CH4 V (TG'CA) (isosquizómero: *Cvi*R I) (NEB). La digestión del producto de PCR fue llevada a cabo en volúmenes de reacción de 20 µL conteniendo Buffer IV (NEB) y 5 unidades de las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III (NEB), con incubación a 37°C durante 4 horas.

El fragmento amplificado del gen mitocondrial Citocromo b contiene 410 pares de bases, cebadores incluidos. Las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III detectan varios sitios polimórficos, generando patrones de restricción específicos para las especies: *F. pulchra*, *F. radiosa*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. limbata*, *F. maxima*. Las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens*, *F. bridgesi* comparten un patrón similar entre si y diferente al de las otras especies. De igual manera, las especies *F. costata* y *F. picta* presentan idénticos fragmentos de restricción (Figura 1).



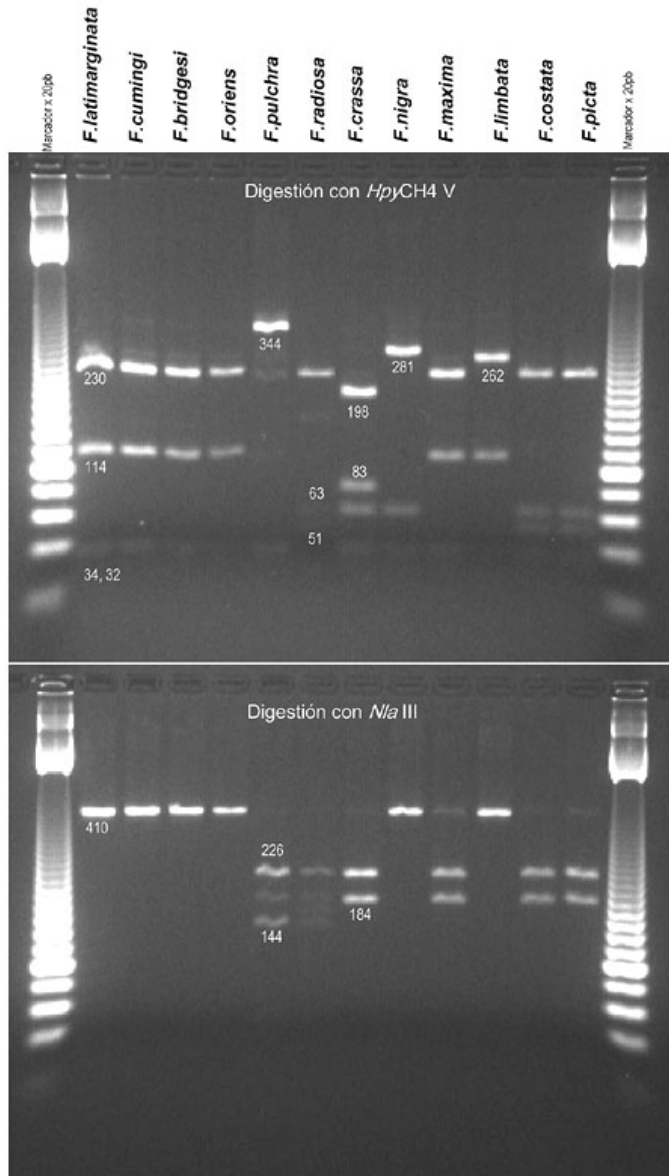


Figura 1. Geles de agarosa mostrando los perfiles de restricción tras la digestión, del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas *HpyCH4 V* y *Nla III*.

Figure 1. Agarose gel showing the restriction profiles observed after digestion of Cytochrome b PCR product with enzymes *Hpy CH4 V* y *Nla III*.

El grupo de *F. latimarginata*, presenta dianas de restricción únicamente para la enzima *Hpy*CH4 V, originando cuatro fragmentos que constituyen el patrón de restricción A. Las otras especies, *F. pulchra*, *F. radiosa*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. limbata* y el grupo de *F. costata* / *F. picta* presentan los patrones B, C, D, E, F y C, respectivamente. En el caso del patrón C, algunos de los individuos morfológicamente clasificados como *F. costata* y *F. picta*, pueden presentar una variante del patrón (Ca) debido a la ausencia de corte del nucleótido 379, debido a una mutación puntual en el seno de la diana de restricción. Con la enzima *Hpy*CH4 V, *F. maxima* presenta un patrón idéntico al del grupo de *F.*

*latimarginata* (A). Sin embargo, tras la digestión con *Nla* III se obtiene un patrón (B) diferente al presentado por el grupo de *F. latimarginata* (sin corte, O). Para esta enzima, *Nla* III, se distinguen tres patrones de restricción, O (sin corte), A y B. En el caso de *F. limbata* y para esta segunda enzima, se ha observado, en algunos individuos, la falta del punto de corte situado en la base 185, pudiendo obtenerse los patrones O y B, sin embargo el patrón F, obtenido con la enzima *Hpy*CH4 V, permite la diferenciación de esta especie, presentando un patrón combinado FO/FB (Tabla 1).

Tabla 1. Recopilación de los cortes producidos y de los fragmentos generados tras la digestión, del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas *Hpy* CH4 V y *Nla* III. A a F: patrones de restricción.

Table 1. Restriction patterns estimated after digestion of Cytochrome b PCR product with enzymes *Hpy* CH4 V and *Nla* III. A to F: restriction profiles.

Especie	Enzima			
	<i>Hpy</i> CH4 V ( <i>Cvi</i> R I)		<i>Nla</i> III	
	Sitios de corte TG*CA	Tamaño fragmentos originados (pb) <sup>a</sup>	Sitios de Corte CATG <sup>c</sup>	Fragmentos originados (pb) <sup>b</sup>
<i>F. latimarginata</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. cumingi</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. bridgesi</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. oriens</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. pulchra</i>	35, 379	32, 34, 344 (B)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. radiosa</i>	35, 98, 149, 379	32, 34, 63, 51, 230 (C)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. crassa</i>	35, 98, 181, 379	32, 34, 63, 83, 198 (D)	185	184, 226 (B)
<i>F. nigra</i>	35, 98, 379	32, 34, 63, 281 (E)	-	-
<i>F. maxima</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	185	184, 226 (B)
<i>F. limbata</i>	35, 149	34, 114, 262 (F)	(185) <sup>a</sup>	(184, 226) <sup>a</sup> (O)/(B)
<i>F. costata</i>	35, 98, 149, (379) <sup>a</sup>	32, 34, 63, 51, 230 (C) / (34, 51, 63, 262) <sup>a</sup> (C <sup>a</sup> )	185	184, 226 (B)
<i>F. picta</i>	35, 98, 149, (379) <sup>a</sup>	32, 34, 63, 51, 230 (C) / (34, 51, 63, 262) <sup>a</sup> (C <sup>a</sup> )	185	184, 226 (B)

<sup>a</sup>Diana con polimorfismo intraespecífico, <sup>b</sup>Longitud estimada para la cadena 5'-3'.

La selección de estas enzimas se ha llevado a cabo procurando la ausencia de sitios polimórficos intraespecíficos en las dianas, crítica para la identificación de las especies (Quinteiro *et al.*, 1998), permitió la generación de patrones fácilmente diferenciables. El protocolo se puede realizar en una única reacción, ya que ambas enzimas (*Hpy*CH4 V y *Nla* II) utilizan el buffer IV de NEB a la misma temperatura de incubación (37°C); aunque el uso exclusivo de BSA, en *Nla* III requiere un ajuste de las condiciones de reacción, acompañada de elevada resolución, preferentemente en geles de acrilamida, de los patrones más complejos en el caso de una digestión combinada.

El producto de PCR, con un tamaño de 410 pb, es obtenible a partir de tejidos extraídos de productos frescos o congelados. Incluso, a partir de tejidos en conservas, donde han sufrido un importante tratamiento térmico, se obtiene ADN con la suficiente calidad para obtener dicho producto PCR (Quinteiro *et al.*, 1998, 2001; Russell *et al.*, 2000). Por ello, esta metodología podría aplicarse a la autenticación de toda la gama de presentación comercial de las lapas del género *Fissurella*. También, podría ser de utilidad en la identificación de individuos en cualquier estadio de su desarrollo ontogenético, (huevos, larvas, semillas y cualquier otro estado reciente asentamiento) en estudios de biología y ecología de las especies del género *Fissurella*.

Los datos mitocondriales y nucleares disponibles son incompatibles con la taxonomía vigente, aunque controvertida, basada en caracteres

morfológicos del cuerpo y de la concha, altamente variables y poco precisos (Riveros-Zúñiga, 1951; Marincovich, 1973; Ramírez-Boehme, 1974; McLean, 1984). En concreto, en las especies del grupo latimarginata (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesi*) y costata (*F. costata* y *F. picta*) se detectan diferentes haplotipos, íntimamente relacionados, que son compartidos entre las distintas especies; es decir, la variabilidad nucleotídica presente no está distribuida conforme a la taxonomía de dichas especies. La metodología descrita identifica estos grupos monofiléticos, basados en caracteres moleculares, aunque la configuración de su rango taxonómico requiere de un consenso entre las alternativas de estudios moleculares, morfométricos y ecológicos.

## AGRADECIMIENTOS

Alberto Olivares Paz realiza una estadía en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela, financiada por la Universidad de Antofagasta y el proyecto MECESUP ANT9902. Los autores agradecen la colaboración prestada por los Sres. Andrés Olguín, Eduardo Díaz y Braulio Montanares, en la colección de parte de los ejemplares empleados para la realización de este estudio. Este trabajo fue posible gracias a las ayudas financieras siguientes: QLK1-CT-2000-30476 de la Unión Europea, PGIDTO1PXJ 20005 PM de la secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia y AGL 2000-3115-CE de la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Economía.

## REFERENCIAS

- Bretos, M. & R. Chihuailaf. 1993.** Studies on the reproduction and gonadal parasites of *Fissurella pulchra* (Gastropoda: Prosobranchia). *Veliger*, 36(3): 245-251.
- Bretos, M. 1988.** Pesquería de lapas en Chile. *Medio Ambiente*, 9(2): 7-12.
- Gaete, N., X. Navarro, F. Constantinescu, C. Mera, D. Selles, M.E. Solari, M.L. Vargas, D. Oliva & L. Durán. 2004.** Una mirada al modo de vida canoero del mar interior desde Piedra Azul. *Chungará*, 36: 333-346.
- Guzmán, N., S. Saa & L. Ortlieb. 1998.** Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). *Estud. Oceanol.*, 17: 17-86.
- Jerardino, A., J.C. Castilla, J.M. Ramírez & N. Hermosilla. 1992.** Early coastal subsistence patterns in Central Chile. A systematic study of the marine invertebrate fauna from the site of Curaumilla. I. *Latin Am. Antiq.*, 3(1): 43-62.
- Marincovich, L. 1973.** Intertidal mollusks of Iquique, Chile. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles Coun. Contr. Sci.*, 16: 1-49.
- McLean, J.H. 1984.** Systematics of *Fissurella* in the Peruviana and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). *Nat. Hist. Mus. Los Angeles Coun. Contr. Sci.*, 354: 1-70.
- Merritt, T.J.S., L. Shi, M.C. Chase, M.A. Rex, R.J. Etter & J.M. Quattro. 1998.** Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7(1): 7-11.
- Oliva, D. & J.C. Castilla. 1992.** Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella* Bruguière, 1789 (Mollusca: Gastropoda) comunes en la pesquería y conchales indígenas de Chile central y sur. *Gayana Zool.*, 56(3-4): 77-108.
- Olivares, A., M. Bretos, R. Chihuailaf & A. Zenis. 1998.** Biometría, hábitat y epibiontes en *Fissurella latimarginata* (Mollusca: Prosobranchia) en el norte de Chile. *Estud. Oceanol.*, 17: 95-103.
- Osorio, C. 2002.** Moluscos marinos en Chile. Especies de importancia económica. Guía para su identificación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, 211 pp.
- Quinteiro, J., C.G. Sotelo, H. Rehbein, S.E. Pryde, I. Medina, R.I. Pérez-Martín, M. Rey-Méndez & I.M. Mackie. 1998.** Use of mtDNA direct Polymerase Chain Reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agr. Food Chem.*, 46: 1662-1669.
- Quinteiro, J., R. Vidal, M. Izquierdo, C.G. Sotelo, R.I. Pérez-Martín, H. Rehbein, G.L. Hold, V.J. Russell, S.E. Pryde, C. Rosa, A.T.**

**Santos & M. Rey-Méndez. 2001.** Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11): 5108-5114.

**Ramírez-Bohme, J. 1974.** Nuevas especies chilenas de *Lucapina*, *Fissurella* y *Collisella* (Mollusca, Archaeogastropoda). *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat., Santiago*, 33: 15-34.

**Riveros-Zúñiga, F. 1951.** Catálogo descriptivo de fissurélidos chilenos. *Rev. Biol. Mar.*, 3(1-2): 89-148.

**Russell, V.J., G.L. Hold, S.E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Méndez, C. González-Sotelo, R.I. Pérez-Martín, A.T. Santos & C. Rosa. 2000.** Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2184-2188.

**Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2003.** Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, 155 pp.

Autor corresponsal: Manuel Rey-Méndez ([bnreymen@usc.es](mailto:bnreymen@usc.es))

\* Trabajo presentado en el XXV Congreso de Ciencias del Mar de Chile y XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar (COLACMAR), realizados en Viña del Mar, entre el 16 y 20 de mayo de 2005.

*Recibido: 20 mayo 2005; Aceptado: 28 abril 2006*